

УДК 615.322

DOI: 10.15372/ChUR2023481

EDN: LDYJVM

## Влияние пероксидной активности башкирского липового меда на антибактериальную активность

М. М. КАНЧУРИНА<sup>1</sup>, Р. Ф. ТАЛИПОВ<sup>1</sup>, Р. Н. КАИПКУЛОВ<sup>2</sup>, Е. С. САЛТЫКОВА<sup>3</sup>,  
Л. Р. ГАЙФУЛЛИНА<sup>3</sup>, М. Д. КАСКИНОВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Уфимский университет науки и технологий,  
Уфа (Россия)

E-mail: iskakovam@mail.ru

<sup>2</sup>Башкирский научно-исследовательский центр по пчеловодству и апитерапии,  
Уфа (Россия)

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
Уфа (Россия)

(Поступила 15.09.22; после доработки 01.12.22)

### Аннотация

Башкирский липовый мед известен не только своим неповторимым ароматом и нежным вкусом, но и лечебными антибактериальными свойствами. Одним из компонентов, отвечающих за бактерицидные свойства меда, является пероксид водорода, который образуется в результате ферментативного окисления глюкозы до глюконовой кислоты под действием вырабатываемого пчелами фермента глюкозооксидазы. В литературе отсутствуют данные об изучении пероксидных антибактериальных свойств башкирского меда. Настоящее исследование посвящено количественному определению содержания пероксида водорода в башкирском липовом меде, собранном из различных природно-сельскохозяйственных зон Республики Башкортостан. Согласно результатам мелиссопалинологического анализа, все изученные 39 образцов меда являются цветочными монофлорными липовыми медами. Концентрация пероксида водорода в них колеблется в пределах 0–51.97 мг/кг · ч. Высокое разнообразие в чувствительности исследованных штаммов условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* к испытанным образцам липового меда дает основание полагать о наличии как пероксидного, так и непероксидного механизмов антибактериальной активности. Непероксидная антибактериальная активность может быть обусловлена медовыми компонентами пчелиного, растительного и микробного происхождения: органическими кислотами, антимикробными белками и пептидами, а также бактериоцинами.

**Ключевые слова:** пероксидная антибактериальная активность, башкирский липовый мед, пероксид водорода, пероксидаза, глюкозооксидаза

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время феномен устойчивости возбудителей инфекционных болезней к лечебным препаратам является серьезной угрозой благополучию и здоровью человечества. С целью

решения данной проблемы Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала и опубликовала в 2001 г. “Глобальную стратегию ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам”, в которой рекомендовано рассматривать указанную проблему в ка-

честве одного из приоритетов национальных систем здравоохранения. В связи с этим главная задача заключается в поиске альтернативных методов лечения бактериальных инфекций. Одно из перспективных направлений – использование медов, так как их антибактериальная активность известна с древних времен [1]. Исследование антибактериальной активности меда началось еще в 1937 г. с открытием вещества, сделанного Дольдом, Ду, Дзиао [2], которое ингибировало рост бактерий в разбавленном меде и получило название “ингибин”. Впоследствии ингибин был идентифицирован как пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) [2–5]. Известно, что для меда характерно два механизма действия антибактериальной активности: пероксидная (ПА) и непероксидная (НПА) [6]. За ПА меда отвечает  $H_2O_2$ , который образуется в результате ферментативного окисления глюкозы до глюконовой кислоты под действием вырабатываемого пчелами фермента глюкозооксидазы. Генерация  $H_2O_2$  является основным механизмом, посредством которого мед проявляет бактериостатическую и бактерицидную активность. Количество  $H_2O_2$ , образующегося в меде, значительно коррелирует с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) и минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) [2, 7–10]. Антибактериальная активность, сохраняющаяся в меде после обработки его каталазой, которая гидролизует  $H_2O_2$  до воды и кислорода, называется НПА. Непероксидную активность обуславливают другие соединения меда, такие как метилглиоксаль, полифенольные кислоты, флавоноиды, антимикробные пептиды и т. д. [8, 11]. В настоящее время, после проведения соответствующих исследований, начато практическое использование препаратов на основе новозеландского меда манука, в котором основным антибактериальным компонентом служит метилглиоксаль. Мед, собранный с мануки, эндемичного для Новой Зеландии растения, является природным антибиотиком, который не обладает побочными эффектами и не наносит вреда организму.

Последние годы уделяется большое внимание изучению антибактериальной активности различных видов меда разного географического происхождения [12–21]. При этом объектами исследования являются самые разнообразные микроорганизмы, начиная с наиболее распространенных биопленкообразующих патогенов дыхательных путей *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* [21], раз-

личных штаммов золотистого и эпидермального стафилококка, синегнойной и кишечной палочки [12, 14, 16, 19] до пищевых патогенов *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [20]. Также особое внимание уделяется изучению взаимосвязи противомикробной активности меда с каким-либо параметром, например: зависимости антибактериальной активности меда от концентрации  $H_2O_2$  [12, 16–19], активности глюкозооксидазы [13, 17, 19], физико-химических параметров меда [15], наличия антимикробных пептидов [17] и содержания макро- и микроэлементов в меде [20].

Среди всех видов меда липовый мед обладает не только своим неповторимым ароматом и нежным вкусом, но и лечебными антибактериальными свойствами. Изучение противомикробной активности европейского липового меда и липового меда из других регионов России показало, что в липовом меде образуется наибольшее количество  $H_2O_2$  по сравнению с другими видами меда [6, 12, 13, 22]. Однако в литературе отсутствуют данные об изучении пероксидных антибактериальных свойств башкирского липового меда. Поэтому настоящее исследование посвящено количественному определению содержания  $H_2O_2$  в башкирском липовом меде, собранном в различных природно-сельскохозяйственных зонах Республики Башкортостан (РБ). Для подтверждения заявленного сорта образцов меда проводили мелиссопалинологический анализ. В качестве биологических свойств образцов липового меда изучали их антибактериальную активность.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Объекты исследования

Объектами исследования служили 39 образцов свежееоткачанного липового меда, собранного с пасек 19 районов РБ: Янаульском, Татышлинском, Балтачевском, Мишкинском, Бирском, Кушнаренковском, Благовещенском, Нуримановском, Иглинском, Архангельском, Туймазинском, Белебеевском, Гафурийском, Белорецком, Бижбулякском, Миякинском, Ишимбайском, Абзелиловском и Зианчуринском.

### Оборудование

Исследования образцов меда выполнялись с использованием следующего оборудования: спектрофотометра UV-2401 PC (Shimadzu, Япония); циркуляционного жидкостного термостата Тур

U4 и UH 16 (VEB MLW Prüfgerate-Werk, Германия); аналитических весов HR-250AZG (AND, Япония); кварцевых кювет (10 мм); микроскопа Биомед-6 вар.3 LED (Биомед, Россия) с камерой UCMOS05100KPA (ТоурСам, Китай); центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия); ламинарного бокса ВЛ-12 (САМПО, Россия); термостата ТС 1/80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия).

#### Препараты и реактивы

В работе использованы следующие реактивы и препараты:

– 0.01 М и 0.4 М фосфатные буферные растворы, рН 6.5 (IbisLab, Россия); 3 % раствор  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, США); стандарт-титр серной кислоты  $c(1/2H_2SO_4) = 0.1$  моль/дм<sup>3</sup> (0.1 н) (АО “Уралхиминвест”, Россия); вода для инъекций (ООО “Гротекс”, Россия).

– Лиофилизированный порошок фермента пероксидазы из корней хрена, тип I, удельная активность биокатализатора составляла 50 ед/мг твердого вещества (с использованием пирогаллола) (Sigma-Aldrich, США); фермент пероксидазу и его растворы хранили при температуре 4 °С.

– Субстрат-восстановитель дигидрохлорид о-дианизидина, полученный по методике [23].

– 0.01 % раствор фуксина основного в 80 % растворе этанола; агаровая среда Мюллера–Хинтона.

#### Мелиссопалинологический анализ меда

Для приготовления микропрепаратов пыльцы к 10 г меда добавляли 20 мл дистиллированной воды, выдерживали при 45 °С в течение 1 ч и размешивали стеклянной палочкой до полного растворения. Раствор меда центрифугировали при 2600 об/мин, надосадочную жидкость сливали, осадок равномерно наносили на предметное стекло. Фиксацию и окрашивание препарата проводили спиртовым раствором фуксина основного. Таксономическую идентификацию пыльцевых зерен медоносов выполняли с использованием пыльцевых атласов [24, 25] (в световом поле микроскопа Биомед-6 при увеличении  $\times 200$ ). Для определения процентного содержания пыльцы различных нектароносов учитывали 500–1000 пыльцевых зерен и падевых элементов.

#### Методика количественного определения пероксида водорода

Все образцы липового меда разбавлялись до 5 % (по объему) 0.4 М фосфатным буфером (рН 6.5). Исходный раствор пероксидазы

приготовили растворением 30 мг пероксидазы в 1 мл 0.01 М фосфатного буфера (рН 6.5). Исходный раствор дихлорида о-дианизидина готовили растворением 10 мг дихлорида о-дианизидина в 10 мл воды (использовалась вода для инъекций). Реакционную смесь готовили смешиванием 0.02 мл исходного раствора пероксидазы и 0.5 мл исходного раствора дихлорида о-дианизидина в 10 мл 0.01 М фосфатного буфера (рН 6.5). Каждый образец раствора меда (0.8 мл) инкубировали 1 ч при 37 °С в жидкостном термостате. После 1 ч добавляли 2.7 мл реакционной смеси и образец инкубировали ровно 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2.4 мл серной кислоты (6 М), затем после 15 с встряхивания измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра UV-2401 PC при 530 нм. Результаты оценивали с использованием программного обеспечения UVProbe 2.21. Количественное определение образующегося  $H_2O_2$  в растворе меда проводили с использованием калибровочного графика. Для этого приготовили 4 калибровочных стандартов с концентрацией (С)  $H_2O_2$  от 1 до 7 мг/л воды (использовалась вода для инъекций) и обрабатывали так же, как образцы без инкубирования. Измерив оптическую плотность (D) стандартных растворов, получили линейную зависимость в координатах  $D = f(C)$ , которая описывается уравнением:  $y = 0.04795x + 0.00095$ . В качестве раствора сравнения использовали смесь 0.8 мл калибровочного стандарта или образца раствора меда, 2.7 мл фосфатного буфера (0.01 М) вместо реакционной смеси и 2.4 мл серной кислоты (6 М) [6].

Для каждого образца меда проводили трехкратное измерение оптической плотности. По результатам измерений вычисляли среднее значение и абсолютную погрешность оптической плотности раствора меда. Относительная погрешность измерений оптической плотности раствора меда не превышает 7 %. Далее, используя среднее значение оптической плотности и линейную зависимость в координатах  $D = f(C)$ , рассчитывали концентрацию  $H_2O_2$  в мг/л · ч. Умножив полученное значение концентрации на 1000 и разделив на массу навески меда, получали количество накопленного  $H_2O_2$  в мг/кг · ч (табл. 1).

#### Антибактериальная активность

Антибактериальную активность меда определяли луночным методом. Готовили 50 % раствор меда с учетом его водности и проводили серию двухкратных разведений. На стандарт-

ную агаризованную среду Мюллера–Хинтона высевали штаммы *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*. Стерильной пробиркой вырезали в агаре лунки, заливали в них по 125 мкл 1.5 % агара в 0.9 % NaCl (45 °С) для формирования дна. В лунки наносили свежеприготовленные растворы меда, через 24 ч измеряли зоны ингибирования роста бактерий растворами меда и определяли МИК – наименьшую концентрацию испытуемого образца меда, при которой еще наблюдалось подавление роста микроорганизма.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Мелиссопалинологический анализ

Согласно результатам мелиссопалинологического анализа, все 39 предоставленных для исследования образцов являлись цветочными монофлорными липовыми медами, поскольку содержали больше 30 % пыльцевых зерен липы сердцелистной и соответствовали требованиям ГОСТ 31766-2012 (см. табл. 1). Источниками вторичной и сопутствующей пыльцы чаще всего были растения семейства Зонтичные: синяк обыкновенный, донник, лядвенец рогатый, ива и клевер ползучий. Падевые элементы в большинстве образцов меда были немногочисленны либо в среднем количестве. Во всех образцах обнаруживалась представленная или умеренно представленная пыльца лабазника. Все образцы по цвету и органолептическим свойствам (запах, вкус и послевкусие) так же соответствовали липовому меду.

### Количественное определение пероксида водорода в образцах липового меда

Из-за низкой активности воды в неразбавленном меде и его кислотной среды, активность глюкозооксидазы довольно низкая, и поэтому образование  $H_2O_2$  в неразбавленном меде незначительно. Только после разбавления меда фермент становится активным и инкубированный раствор меда при 37 °С в течение 1 ч образует  $H_2O_2$ , который может действовать антибактериально. Для количественного определения образовавшегося  $H_2O_2$  в растворе меда используется вторая ферментативная реакция, в результате которой пероксид водорода под влиянием фермента пероксидазы окисляет *o*-дианизидин. При этом продукт окисления в растворе серной кислоты приобретает красный цвет, поглощающий свет при 530 нм [6].

Для всех 39 образцов башкирского липового меда количественно определено содержание  $H_2O_2$  по методике, описанной в экспериментальной части (см. табл. 1). Из представленных данных видно, что липовый мед, независимо от территориального происхождения, содержит различное количество  $H_2O_2$ , которое колеблется от 0 до 51.97 мг/кг · ч. По всей вероятности, конечная концентрация  $H_2O_2$  в растворе меда является результатом разности между уровнями его ферментативного или неферментативного синтеза и разложения. К неферментативным процессам синтеза  $H_2O_2$  относят автоокисление полифенолов до хинонов и результат жизнедеятельности молочнокислых бактерий, содержащихся в меде. Ферментативные процессы разложения  $H_2O_2$  связаны с работой металлоферментов и каталазы. Разложение  $H_2O_2$  под действием аскорбиновой кислоты и по реакции Фентона протекает без участия ферментов. Также на концентрацию  $H_2O_2$  может влиять различное содержание глюкозооксидазы, вносимое в мед с секретом гипофарингеальных желез пчел во время сбора нектара, поскольку выработка глюкозооксидазы зависит от возраста и выполняемой задачи пчелы [26]. Следовательно, все вышеописанные факторы могут влиять на конечную концентрацию  $H_2O_2$ .

### Антибактериальная активность

Исследованные образцы меда проявили различную степень антагонистической активности по отношению к штаммам *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* (рис. 1, табл. 2) – от отсутствия таковой до высокой. Строгой приуроченности антибактериальной активности исследованных образцов меда к району сбора, к содержанию липовых зерен и  $H_2O_2$  не наблюдается. Однако если рассмотреть влияние процентного содержания пыльцевых зерен липы на антибактериальную активность, можно увидеть следующую зависимость. Наименьшая МИК по отношению к *S. aureus* зарегистрирована у образцов с высоким и чрезвычайно высоким содержанием пыльцы липы (№ 11, 14, 23, 25). Что касается *P. aeruginosa*, то данный штамм неожиданно проявил чувствительность к отдельным образцам меда как с высоким, так и со средним содержанием пыльцы липы. Антибактериальная активность образцов № 1, 2, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 37 и 38 сопоставима с таковой у меда *A. serana* и меда манука (см. рис. 1, с). Последний официально признан лекарственным средством с наиболее высокой антибактериальной НПА среди известных сортов меда [27].

ТАБЛИЦА 1

Концентрация пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и процентное содержание пыльцевых зерен липы мёдов, собранных в разных районах Республики Башкортостан (РБ)

Номер п/п	Район РБ	Номер образца меда	Оптическая плотность раствора меда, $D$	Концентрация $H_2O_2$ , мг/л · ч	Концентрация $H_2O_2$ , мг/кг · ч	Пыльцевые зерна липы, %
<b>Северная лесостепная зона</b>						
1	Архангельский	1	0	0	0	70.2
2	Архангельский	2	0.166±0.002	3.44	48.45	89.2
3	Архангельский	3	0.062±0.002	1.27	17.89	72.1
4	Архангельский	4	0.023±0.001	0.46	6.38	80.6
5	Архангельский	6	0.066±0.001	1.36	18.63	74.6
6	Бирский	10	0.087±0.001	1.80	25.35	88.2
7	Янаульский	12	0.113±0.003	2.34	32.96	54.1
8	Благовещенский	13	0.030±0.001	0.61	8.64	92.8
9	Архангельский	14	0.044±0.001	0.90	12.68	85.6
10	Иглинский	19	0.035±0.001	0.70	9.86	67.8
11	Иглинский	20	0.065±0.003	1.34	18.38	70.0
12	Янаульский	21	0.026±0.001	0.52	7.32	95.5
13	Балтачевский	22	0.124±0.001	2.56	36.06	85.5
14	Бирский	24	0.010±0.001	0.19	2.68	34.7
15	Благовещенский	26	0.114±0.001	2.36	33.24	49.7
16	Иглинский	27	0.011±0.002	0.21	2.96	95.8
17	Архангельский	28	0.162±0.003	3.36	47.32	63.2
18	Янаульский	29	0.054±0.001	1.11	15.63	88.2
19	Архангельский	30	0.033±0.001	0.67	9.44	68.2
20	Нуримановский	31	0.145±0.003	3.00	42.25	78.2
21	Иглинский	33	0.032±0.001	0.65	9.15	47.4
22	Архангельский	34	0.060±0.001	1.23	17.32	78.9
23	Иглинский	35	0.043±0.003	0.88	12.40	94.4
24	Татышлинский	36	0.136±0.003	2.81	39.58	86.0
25	Мишкинский	39	0.031±0.002	0.63	8.87	91.5
<b>Южная лесостепная зона</b>						
26	Гафурийский	5	0.177±0.002	3.67	51.69	81.7
27	Гафурийский	8	0.153±0.003	3.17	43.41	48.5
28	Ишимбайский	9	0.119±0.002	2.46	34.65	77.9
29	Кушнаренковский	11	0.043±0.001	0.88	12.39	93.8
30	Гафурийский	15	0.014±0.001	0.27	3.80	84.7
31	Ишимбайский	38	0.037±0.002	0.75	10.56	72.3
<b>Предуральская степная зона</b>						
32	Миякинский	7	0.032±0.002	0.65	9.15	70.3
33	Белебеевский	23	0.030±0.002	0.61	8.59	83.9
34	Туймазинский	25	0.011±0.001	0.21	2.96	85.7
35	Бижбулякский	32	0.178±0.008	3.69	51.97	30.0
36	Татышлинский	37	0.130±0.001	2.69	37.89	66.4
<b>Зауральская степная зона</b>						
37	Абзелиловский	16	0.043±0.003	0.88	12.48	59.7
<b>Горно-лесная зона</b>						
38	Белорецкий	17	0.138±0.001	2.86	39.90	68.0
39	Белорецкий	18	0.028±0.001	0.56	7.89	86.4

Примечание. Для оптической плотности раствора меда представлены среднее значение ± абсолютная погрешность для трехкратных измерений.

ТАБЛИЦА 2

Антибактериальная активность липовых медов, собранных в разных районах Республики Башкортостан (РБ)

Номер образца меда	Район РБ	Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мг/кг · ч	МИК меда, %		
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	Архангельский	0	50.00	25.00	6.25
2	Архангельский	48.45	50.00	25.00	6.25
3	Архангельский	17.89	–	25.00	50.00
4	Архангельский	6.38	–	–	50.00
5	Гафурыйский	51.69	25.00	–	50.00
6	Архангельский	18.62	25.00	–	50.00
7	Миякинский	9.15	25.00	–	12.50
8	Гафурыйский	43.41	25.00	25.00	50.00
9	Ишимбайский	34.65	25.00	–	50.00
10	Бирский	25.35	25.00	–	50.00
11	Кушнаренковский	12.39	12.50	25.00	50.00
12	Янаульский	32.96	25.00	25.00	50.00
13	Благовещенский	8.637	50.00	50.00	50.00
14	Архангельский	12.68	12.50	50.00	50.00
15	Гафурыйский	3.80	50.00	50.00	6.25
16	Абзелитовский	12.48	25.00	25.00	6.25
17	Белорецкий	39.90	50.00	25.00	6.25
18	Белорецкий	7.89	25.00	25.00	6.25
19	Иглинский	9.86	50.00	25.00	50.00
20	Иглинский	18.38	25.00	25.00	50.00
21	Янаульский	7.32	25.00	–	6.25
22	Балтачевский	36.06	25.00	50.00	6.25
23	Белебеевский	8.59	12.50	–	25.00
24	Бирский	2.68	50.00	25.00	50.00
25	Туймазинский	2.96	12.50	–	25.00
26	Благовещенский	33.24	50.00	–	50.00
27	Иглинский	2.96	25.00	25.00	25.00
28	Архангельский	47.32	50.00	50.00	50.00
29	Янаульский	15.63	25.00	25.00	25.00
30	Архангельский	9.44	50.00	25.00	50.00
31	Нуримановский	42.25	25.00	25.00	12.50
32	Бижбулякский	51.97	50.00	25.00	50.00
33	Иглинский	9.15	50.00	25.00	50.00
34	Архангельский	17.32	50.00	50.00	50.00
35	Иглинский	12.40	50.00	25.00	50.00
36	Татышлинский	39.58	50.00	25.00	25.00
37	Зианчуринский	37.89	50.00	25.00	6.25
38	Ишимбайский	10.56	50.00	–	6.25
39	Мишкинский	8.87	25.00	25.00	50.00
Мед манука			3.125–6.25	6.25	3.13–6.25
Мед <i>Apis cerana</i>			–	12.5	–

Примечания. 1. МИК (минимальная ингибирующая концентрация) – наименьшее разведение меда, при котором все еще наблюдается подавление роста бактерий. 2. Прочерк – отсутствие антибактериальной активности. 3. Серым цветом выделены наименьшие МИК по отношению к штаммам *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

В исследованиях липового меда европейского происхождения его антимикробная активность характеризуется от низкой до очень вы-

сокой. Так, венгерский липовый мед обладал антибактериальной активностью к *S. aureus* и *P. aeruginosa* с МИК около 50 % [20, 21], а поль-

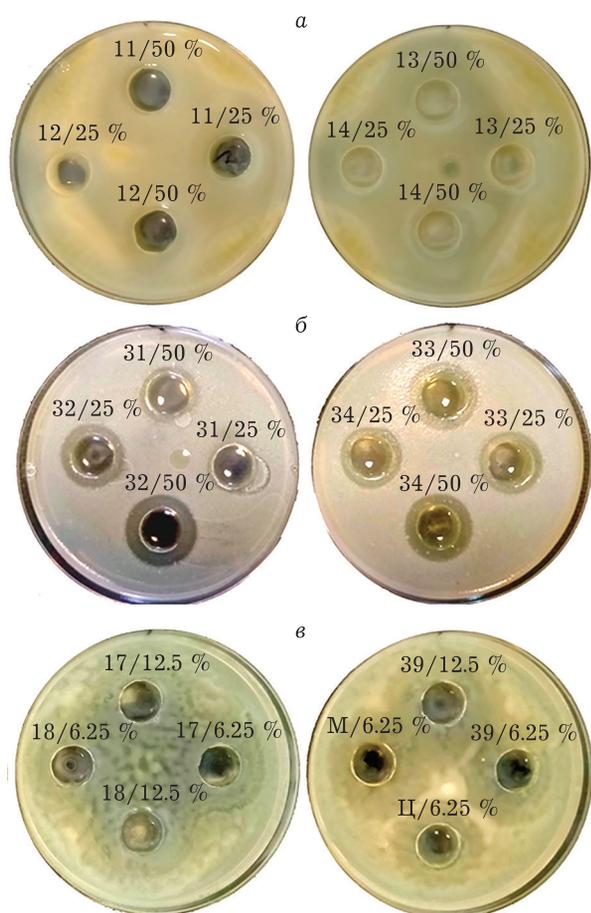


Рис. 1. Антимикробная активность отдельных образцов липового меда по отношению к *Staphylococcus aureus* (а), *Escherichia coli* (б) и *Pseudomonas aeruginosa* (в). Условные обозначения: № образца/концентрация меда %; М – мед манука, Ц – мед *Apis cerna*.

ский липовый мед ингибировал некоторые грамположительные и грамотрицательные штаммы лишь в концентрациях 80–90 % [28]. Вместе с тем, балканский липовый горный мед показал очень высокую антибактериальную активность по отношению к *S. aureus* и *S. epidermidis* с МИК 3.12 и 6.25 % соответственно [29]. Итальянский липовый мед обладал высокой антибактериальной активностью против *P. aeruginosa*, слабо ингибировал рост *S. aureus* и стимулировал рост других микроорганизмов – *Candida albicans* и *Bacillus cereus* [30]. Различия в данных по антимикробной активности и значениям МИК липового меда могут быть обусловлены как неоднородностью методов и приемов, выбранных для тестирования, так и разнообразием исследуемых штаммов, видовыми особенностями и условиями произрастания основного, вторичных и сопутствующих нектароносителей, подвидами особенностями медоносной пчелы и множеством

других факторов, влияющих на качественный и количественный состав и биологические свойства меда.

Для оценки влияния концентрации  $H_2O_2$  на антибактериальную активность для трех штаммов условно-патогенных микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* рассмотрели корреляцию между МИК и концентрацией  $H_2O_2$  (рис. 2–4). Оказалось, что строгой зависимости между двумя вышеописанными параметрами нет, так как среди образцов липового меда наименьшая величина МИК по отношению к *S. aureus* и *P. aeruginosa* зарегистрирована у образцов с низким, средним и высоким содержанием  $H_2O_2$  (№ 1, 2, 11, 14–18, 21, 22, 37, 38). По всей вероятности, на антибактериальную активность липового меда влияет не только высокое содержание  $H_2O_2$ , но и компоненты меда, отвечающие за НПА. Последними могут быть вещества пчелиного, растительного и микробного происхождения, способные подавлять или уничтожать микроорганизмы. Так, органические кислоты – глюконовая, уксусная, масляная, лимонная, муравьиная, молочная, малеиновая, яблочная, щавелевая, фумаровая, пироглутаминовая, янтарная, пировиноградная, винная, ароматические кислоты и кислоты маточного молочка – затрудняют рост микроорганизмов, создавая низкий уровень рН [29, 30]. Источниками органических кислот меда являются нектар, падь, молочнокислые бактерии, населяющие зобик и участвующие в ферментации нектара, но подавляющее большинство из них вырабатывается из нектара и падевых сахаров под действием ферментов, выделяемых пчелами во время созревания и хранения меда [31]. Бактериоцины и другие продукты жизнедеятельности микробиоты медового зобика, также могут вносить вклад в общую антимикробную активность меда [32, 33]. Антимикробные белки и пептиды меда, прежде всего, белки маточного молочка, секретируемые гипофарингеальными железами рабочих пчел, вызывают серьезные повреждения мембран грамотрицательных и грамположительных бактерий и являются неотъемлемой частью механизма бактерицидного действия меда [34].

С другой стороны, наличие в меде разнообразных органических и неорганических веществ и ферментов определяет его как изменчивую биологическую субстанцию, в которой протекают биохимические реакции, изменяющие исходную концентрацию ряда веществ. Пероксид водорода в меде со временем разлагается ферментативными и неферментативными реакциями.

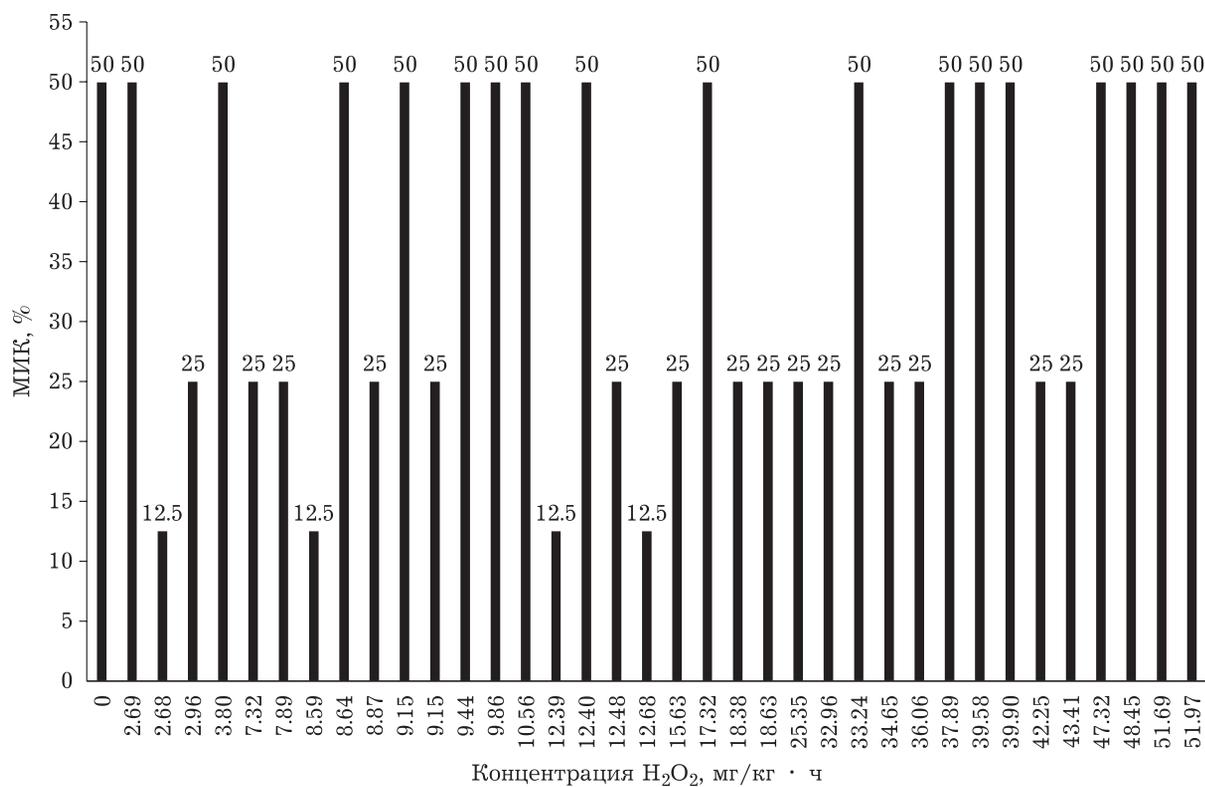


Рис. 2. Зависимость минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для штамма условно-патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus*.

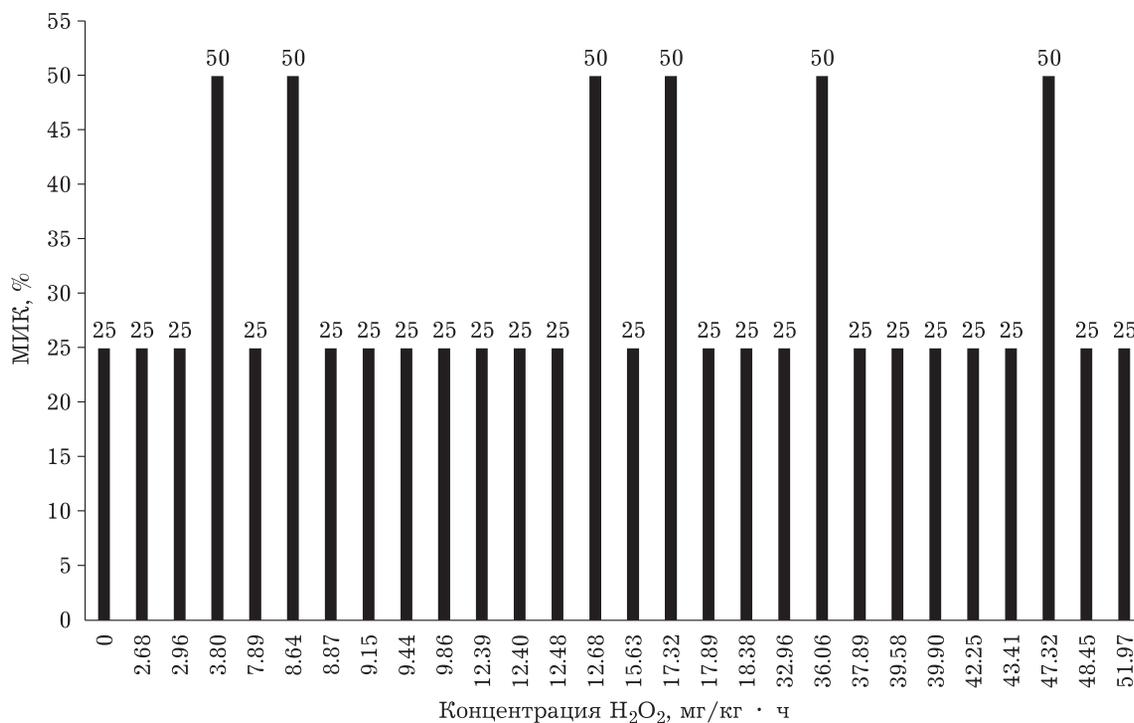


Рис. 3. Зависимость минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для штамма условно-патогенного микроорганизма *Escherichia coli*.

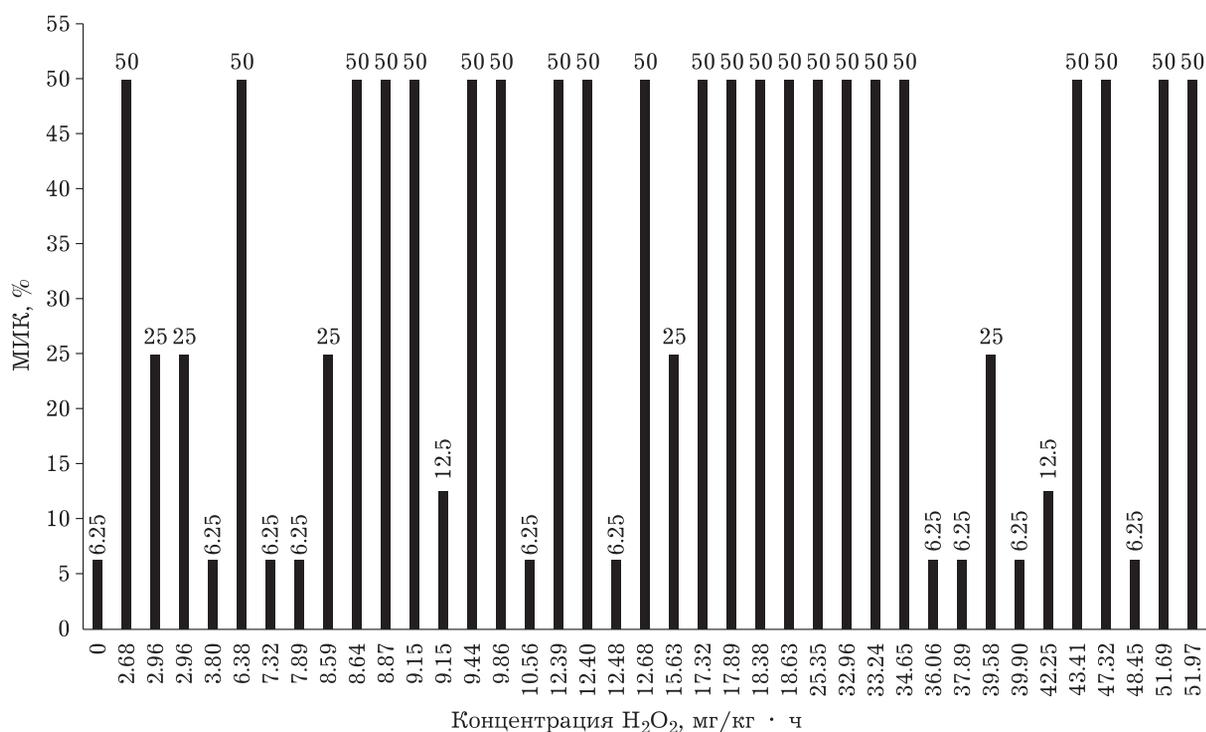


Рис. 4. Зависимость минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для штамма условно-патогенного микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa*.

Fe<sup>3+</sup>-зависимая каталаза, источником которой в меде является нектар и микроорганизмы, катализирует превращение двух молекул пероксида водорода в две молекулы воды и одну молекулу кислорода [26, 35]. В меньшей степени в процессах превращения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в H<sub>2</sub>O участвуют другие металлоферменты – пероксидазы и супероксиддисмутазы [36]. Кроме того, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в меде может разлагаться и неферментативным путем. Так, гидроаскорбиновая кислота (витамин С) отдает два протона и два электрона пероксиду водорода, восстанавливая его до воды и кислорода [26, 37]. Второй неферментативной реакцией, которая расходует H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из меда, является реакция Фентона: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> реагирует с Fe<sup>2+</sup> и/или полифенолами с образованием гидроксид-ионов, кислорода, гидроксильных и супероксидных радикалов, которые способствуют антибактериальной активности меда, повреждая бактериальные клетки и ДНК [35, 36].

Таким образом, различия общей антибактериальной активности исследованных образцов липового меда, на наш взгляд, могут быть обусловлены индивидуальными особенностями пчелиных семей: активностью ферментов, качественными и количественными характеристиками белкового синтеза, состава и метаболической активности микробиома медового зобика.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам мелиссопалинологического анализа все 39 предоставленных для исследования образцов являются цветочными монофлорными липовыми медами, поскольку содержат больше 30 % пыльцевых зерен липы сердцелистной и соответствуют требованиям ГОСТ 31766-2012. Они обладают в целом средней антибактериальной активностью по отношению к штаммам условно-патогенных микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*. Высокое разнообразие в чувствительности исследованных штаммов бактерий к испытанным образцам липового меда дает основание полагать о наличии как пероксидного, так и непероксидных механизмов антибактериальной активности. Данные механизмы, скорее всего, носят индивидуальный характер и могут отражать подвидовые особенности медоносной пчелы. На территории Башкортостана в практике пчеловодства используются медоносные пчелы подвидов *Apis mellifera mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica* и их гибриды, различающиеся адаптивным потенциалом. В данном исследовании нами не учитывалось подвидовая принадлежность пчелиных семей, которыми были собраны меды. Но, несомненно, данный аспект

представляет научный интерес для дальнейших исследований.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и УНУ “Кодинк” Уфимского федерального исследовательского центра РАН в рамках госзадания РАН (№ гос. регистрации АААА-А21-121011990120-7) и Минсельхоза Республики Башкортостан (№ гос. регистрации 721940.Р.03.1.00180001003).

Коллектив исследователей выражает признательность и благодарность пчеловодам Республики Башкортостан, предоставившим образцы меда для испытаний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Аганин А. В. Мед и его исследование. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1985. 152 с.
- 2 White J. W., Subers M. H., Schepartz A. I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system // *Biochim. Biophys. Acta.* 1963. Vol. 73. P. 57–70.
- 3 Eteraf-Oskouei T., Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 2013. Vol. 16. P. 731–742.
- 4 Mandal M. D., Mandal S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2011. Vol. 1, No. 2. P. 154–160.
- 5 White J. W., Jr., Subers M. S. Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay // *J. Apic. Res.* 1963. Vol. 2, No. 2. P. 93–100.
- 6 Rückriemen J. Carbonyl compounds in Manuka honey: Antibacterial activity, reactions and metabolic transit, Dissertation, Dr. rer. nat., Dresden, 2018. 258 p.
- 7 Allen K. L., Molan P. C., Reid G. M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1991. Vol. 43, No. 12. P. 817–822.
- 8 Molan P. C. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity // *Bee World.* 1992. Vol. 73, No. 2. P. 59–76.
- 9 Brudzynski K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys // *Can. J. Microbiol.* 2006. Vol. 52, No. 12. P. 1228–1237.
- 10 Brudzynski K., Abubaker K., Martin L., Castle A. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey // *Front. Microbiol.* 2011. Vol. 2. Art. 213.
- 11 Kwakman P. H. S., te Velde A. A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls M. J. C., Zaat S. A. J. How honey kills bacteria // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, No. 7. P. 2576–2582.
- 12 Farkasova J., Bugarova V., Godocikova J., Majtan V., Majtan J. The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys // *Eur. Food Res. Technol.* 2019. Vol. 245. P. 2739–2744.
- 13 Strelec I., Crevar B., Kovac T., Rajs B. B., Primorac L., Flanjak I. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys // *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2018. Vol. 10, No. 1. P. 33–41.
- 14 Matzen R. D., Leth-Espensen J. Z., Jansson T., Nielsen D. S., Lund M. N., Matzen S. The antibacterial effect *in vitro* of honey derived from various Danish flora // *Dermatology Research and Practice.* 2018. Vol. 2018. Art. 7021713.
- 15 Alygizou A., Grigorakis S., Gotsiou P., Loupassaki S., Calokerinos A. S. Quantification of hydrogen peroxide in Greta honey and correlation with physicochemical parameters // *J. Anal. Methods Chem.* 2021. Vol. 2021. Art. 5554305.
- 16 Zhang Y.-Z., Si J.-J., Li S.-S., Zhang G.-Z., Wang S., Zheng H.-Q., Hu F.-L. Chemical analyses and antimicrobial activity of nine kinds of unifloral Chinese honeys compared to Manuka honey (12+ and 20+) // *Molecules.* 2021. Vol. 26, No. 9. P. 2778–2794.
- 17 Proano A., Coello D., Villacres-Granda I., Ballesteros I., Debut A., Vizuete K., Brenciani A., Alvares-Suarez J. M. The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey // *LWT.* 2021. Vol. 136, Part 1. Art. 110379.
- 18 Guttentag A., Krishnakumar K., Cokcetin N., Harry E., Carter D. Factors affecting the production and measurement of hydrogen peroxide in honey samples // *Access Microbiol.* 2021. Vol. 3, No. 3. Art. 198.
- 19 Godocikova J., Bugarova V., Kast C., Majtan V., Majtan J. Antibacterial potential of Swiss honeys and characterisation of their bee-derived bioactive compounds // *J. Sci. Food Agric.* 2020. Vol. 100, No. 1. P. 335–342.
- 20 Farkas A., Balázs V. L., Koszegi T., Csepregi R., Kerekes E., Horváth G., Szabó P., Gaál K., Kocsis M. Antibacterial and biofilm degradation effects of Hungarian honeys linked with botanical origin, antioxidant capacity and mineral content // *Front. Nutr.* 2022. Vol. 9. Art. 953470.
- 21 Balázs V. L., Nagy-Radványi L., Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria // *Foods.* 2021. Vol. 10, No. 7. P. 1632–1648.
- 22 Ярова О. А., Лобанов А. Б. Применение метода определения содержания пероксида водорода для ветеринарно-санитарной оценки меда // *Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.* 2012. № 1 (7). С. 1–5.
- 23 Франке Э., Франц П., Варнке В. Химия отравляющих веществ. М.: Химия, 1973. 404 с.
- 24 Курманов Р. Г., Ишбирдин А. Р. Пыльцевой атлас. Уфа: Гилем, 2013. 299 с.
- 25 Карпович И. В., Дребезгина Е. С., Еловицова Е. А., Лероткина Г. И., Зубова Е. Н., Кузьяев Р. З., Хисматуллин Р. Г. Атлас пыльцевых зерен. Екатеринбург: Уральский рабочий, 2015. 318 с.
- 26 Brudzynski K. A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review // *Food Chem.* 2020. Vol. 332, No. 12. Art. 127229.
- 27 Hulea A., Obistioiu D., Cocan I., Alexa E., Negrea M., Neacsu A. G., Hulea C., Pascu C., Costinar L., Iancu I., Tirziu E., Herman V. Diversity of monofloral honey based on the antimicrobial and antioxidant potential // *Antibiotics.* 2022. Vol. 11, No. 5. P. 595–621.
- 28 Goslinski M., Nowak D., Klebukowska L. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys // *J. Food Sci. Technol.* 2019. Vol. 57, No. 4. P. 1269–1277.
- 29 Sakač M., Jovanov P., Marić A., Četojević-Simin D., Novaković A., Plavšić D., Škrobot D., Kovač R. Antioxidative, antibacterial and antiproliferative properties of honey types from the Western Balkans // *Antioxidants.* 2022. Vol. 11, No. 6. Art. 1120.
- 30 Pătruică S., Alexa E., Obistioiu D., Cocan I., Radulov I., Berbecea A., Lazăr R. N., Simiz E., Vicar N. M., Hulea A., Moraru D. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of some types of honey from Banat region, Romania // *Molecules.* 2022. Vol. 27, No. 13. Art. 4179.

- 31 Machado De-Melo A. A., Almeida-Muradian L., Sancho M. T., Pascual-Mate A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review // *J. Apic. Res.* 2017. Vol. 57, No. 13. P. 5–37.
- 32 Brudzynski K. Honey as an ecological reservoir of antibacterial compounds produced by antagonistic microbial interactions in plant nectars, honey and honey bee // *Antibiotics.* 2021. Vol. 10, No. 5. P. 551–582.
- 33 Samani M. K., Noormohammadi Z., Fazeli M. R., Samadi N. Bacteriocin activity of various iranian honey-associated bacteria and development of a simple medium for enhanced bacteriocin activity // *J. Environ. Health Sci. Eng.* 2021. Vol. 19, No. 11. P. 427–435.
- 34 Brudzynski K., Sjaarda C. Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible for the cell wall lytic and bactericidal activities of honey // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10, No 4. Art. e0120238.
- 35 Alshareef R. M. H., Al-Farhan B. S., Mohammed M. E. A. Glucose oxidase and catalase activities in honey samples from the southwestern region of Saudi Arabia // *Appl. Sci.* 2022. Vol. 12. P. 7584–7595.
- 36 Alaerjani W. M. A., Abu-Melha S., Alshareef R. M. H., Al-Farhan B. S., Ghramh H. A., Al-Shehri B. M. A., Bajaber M. A., Khan K. A., Alrooqi M. M., Modawe G. A. Biochemical reactions and their biological contributions in honey // *Molecules.* 2022. Vol. 27, No. 15. Art. 4719.
- 37 Majtan J., Sojka M., Palenikova H., Bucekova M., Majtan V. Vitamin C enhances the antibacterial activity of honey against planktonic and biofilm-embedded bacteria // *Molecules.* 2020. Vol. 25, No. 4. Art. 992.