

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ
ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ ВЕЩЕСТВ
BACILLUS CIRCULANS И *PAENIBACILLUS POLYMYXA***

Калмантаев Т.А., Садикова Г.Т., Перельгин В.В., Похиленко В.Д.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии.

142279, Московская обл., пос. Оболенск.

Тел: (4967) 36-00-03, e-mail: info@obolensk.org <http://www.obolensk.org>

Резюме. В работе использовали выделенные из окружающей среды штаммы *Bacillus circulans* и *Paenibacillus polymyxa*, которые продуцируют бактериоциноподобные субстанции широкого спектра антимикробного действия, а в качестве пленкоформирующей основы - поливиниловый спирт.

Проведенные исследования показали практическую возможность применения полимерных пленок с бактериоциноподобными веществами бацилл для снижения уровня микробной контаминации пищевых продуктов. Определены условия получения бактериоциноподобных субстанций с целью практического использования в составе антибактериальных пленок. Установлено, что лучшими показателями по ингибированию микроорганизмов на поверхности мясосодержащего продукта обладали полимерные покрытия с бактериоциноподобной субстанцией на основе штаммов *Bacillus circulans*.

Ключевые слова: антимикробные пленки, бактериоцины, бактериоциноподобные субстанции, штаммы-продуценты, пищевые продукты.

**PRODUCTION AND TESTING THEIR EFFICACY OF ANTIMICROBIAL
POLYMERIC COATINGS USING BACTERICIDAL AGENTS ISOLATED FROM
BACILLUS CIRCULANS AND *PAENIBACILLUS POLYMYXA***

Kalmantaev T.A., Sadikova G.T., Perelygin V.V., Pokhilenko V.D.

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology.

142279, Obolensk, Moscow reg., Russia.

Tel.: (4967) 36-00-03, e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

Abstract. In the research we used our environmentally isolated strains of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* that produced bacteriocin-like substances (BLIS) with

wide-spectrum antimicrobial activity. Safe and biocompatible polyvinyl alcohol was a key component during film formation.

A potential of BLIS from research bacilli in the composition of polymer films to minimize microbial contamination in foodstuff was shown. Conditions required to produce these bactericidal substances on the practical purpose as a part of antibacterial films were determined. The best inhibiting activity of biofilms was found for BLIS on strains *Bacillus circulans*.

Key words: antimicrobial films, bacteriocins, bacteriocin-like substances, producing strains, foodstuff.

Введение. Использование полимерных антимикробных пленок с целью уменьшения числа вредных бактерий в продуктах питания явление не новое. Сегодня производство полифункциональных полимерных покрытий стало востребованной и быстро развивающейся отраслью. Для области пищевых технологий это продление сроков хранения пищевых продуктов, для медицины и ветеринарии – ранозаживляющие средства, для экологии – биodeградируемые упаковки и т.д. Были предложены различные подходы для создания съедобных и полимерных пленок, содержащих некоторые разрешенные бактериоцины, которые могли бы быть использованы для обработки продовольствия, включая мясные пищевые продукты. Так, Siragusa G. из сельскохозяйственной службы (ARS) США инкорпорировал низин - хорошо известный бактериоцин из группы лантибиотиков, в полимерные пленки для ингибирования роста бактерий на поверхности мясных продуктов [1]. Однако низин, как известно, имеет узкий спектр антимикробного действия и эффективен лишь в кислой среде. Другие же бактериоцины не столь широко исследованы для применения в составе антибактериальных пленок. Для расширения спектра антимикробного действия низина, который распространялся бы и на грамотрицательные бактерии, было предложено дополнительно использовать хелатирующие агенты [2]. Очевидно, что другие классы бактериоцинов, действующие и на представителей грамотрицательных бактерий, имеют больше оснований стать кандидатами для включения в защитные полимерные пленки, поскольку отпадает необходимость в модификации их специальными веществами.

Следовательно, при создании пленкоформирующих покрытий с антимикробными свойствами практическую ценность представляет возможность использования в их составе безвредных природных антибиотиков, какими теперь все больше представляются бактериоцины или подобные им субстанции [4]. В этой связи в качестве продуцентов этих веществ с изначально более широким спектром антимикробного действия, чем низин, научный и практический интерес представляют спорообразующие бациллы видов *B.*

circulans – *P. polymyxa* [4, 5]. Представители этой группы микроорганизмов, как правило, не патогенны ни для человека, животных, ни для растений [6] и применяются, например, для мацерации кормов животных, поскольку способны деградировать такие сложные полисахариды как целлюлоза, крахмал, пектин и др. [4, 7].

В данной работе использовали выделенные из окружающей среды природные штаммы *Bacillus circulans* и *Paenibacillus polymyxa*, которые продуцируют бактериоциноподобные субстанции (БПС) широкого спектра антимикробного действия. В сравнительных экспериментах использовали также природные штаммы-продуценты низиноподобных веществ. В качестве пленкоформирующей основы применяли поливиниловый спирт (ПВС) – доступный, нетоксичный и биосовместимый полимер, широко используемый в биотехнологии, медицине, пищевой промышленности и др. [8, 9].

Материалы и методы. Работу проводили со штаммами 1 Кв, 1580, Ск2ч, В- 222 (а, ф), В-1969 *B. circulans*, 602 *P. polymyxa* и 33.22 *Enterococcus faecium*. После реактивации клеток из лиофилизированного состояния их высевали на чашки с ГРМ-агаром (производство ГНЦ ПМБ, Россия) и культивировали при 30°C в течение двух суток. Для получения посевного материала одиночные типовые колонии переносили в пробирку со стерильным изотоническим раствором хлористого натрия и суспендировали с использованием мешалки типа BioVortex, добиваясь получения 1 млрд взвеси по стандарту мутности Тарасевича Л.И. Микробной взвесью (1%, объем/объем) засеивали 750 мл качалочные колбы со 100 мл питательной среды. Для всех штаммов бацилл применяли разработанную нами пропись среды без гидролизатов белка животного происхождения в составе (г/л): дрожжевой экстракт – 5,0; виннокислый аммоний – 5,0; глицерин – 1,0; калия фосфат двухзамещенный трехводный – 3,0; натрия хлорид – 1,0; калия хлорид – 1,0 и магния сульфат 0,005 (рН готовой среды – 7,5 ед.). Для штамма энтерококков использовали среду в составе (г/л): гидролизат казеина - 10,0; дрожжевой экстракт - 5,0; глюкоза - 20,0; натрия цитрат - 5,0; натрия хлорид - 5,0; магния сульфат - 0,5; калий фосфорнокислый двухзамещенный - 1,0 (рН готовой среды - 6,8 ед.). Бациллы культивировали при 29 - 30°C при перемешивании (New Brunswick Scientific, USA) при 130 об/мин в течение 48-72 ч, энтерококки – в тех же условиях при температуре 32 - 33° С в течение 14 – 16 ч.

Бактериоциноподобную субстанцию из культуральной жидкости (КЖ) бацилл выделяли центрифугированием с последующей стерилизацией бесклеточного супернатанта автоклавированием (0,5 ати, 20 мин). БПС из КЖ энтерококков получали, как было описано нами ранее [10]. В качестве основы пленкоформирующего покрытия использовали растворимый в воде поливиниловый спирт (ПВС 11/2, Serva). В

охлажденный раствор БПС вводили навеску (10%, вес/объем) ПВС, которую растворяли при нагревании до 90 °С. Контролем служил водный раствор ПВС той же концентрации без БПС. Нарезки свежих коммерческих сосисок (высота блока 10 мм), выбранные нами в качестве объекта наблюдений, обрабатывали со всех сторон растворами пленкоформирующего полимера. Эту процедуру для удобства проводили в стерильных чашках Петри. Обработанные пробы оставляли при комнатной температуре (22±2° С) на 3 часа для испарения влаги и формирования пленочного покрытия (рисунок 1). Одну партию проб хранили в течение 5 суток, другую – 10 суток в условиях постоянной температуры (22±2° С) и влажности (65%).

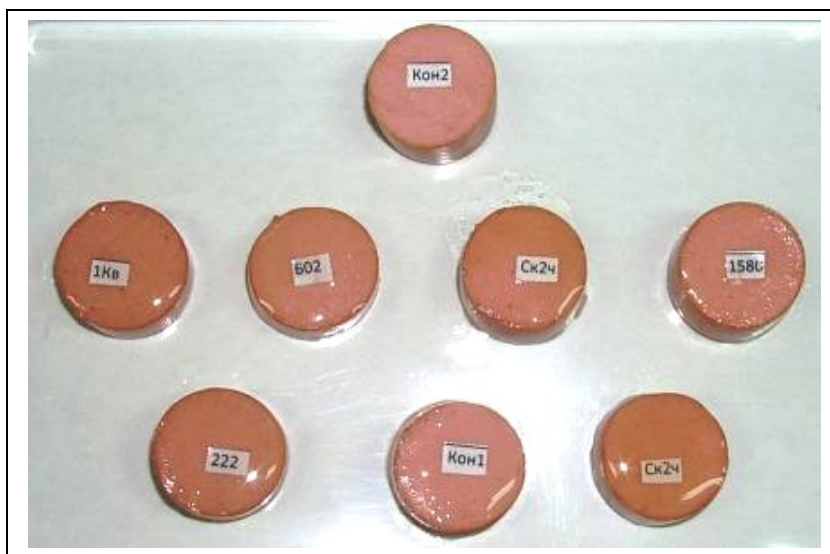


Рисунок 1. Вид срезов сосисок через 3 ч после нанесения образцов пленочного покрытия
Контроли: Кон1 - пленка без БПС; Кон2 - без пленки и без БПС.
1 Кв, СК2ч, 1580, 222, 602 - варианты БПС в составе ПВС пленок.

Уровень микробной контаминации образцов сосиски в процессе хранения контролировали помещением их в колбы со стерильной дистиллированной водой, перемешиванием в течение 30 мин, отбором проб воды (по 10 мкл) и высевом их на три чашки с ГРМ-агаром. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37° С в течение 24 и 48 ч. Путем подсчета выросших колоний определяли общую концентрацию микроорганизмов в пробах, определяли среднее значение для каждой пробы, а по форме колоний, окраске и морфологии клеток оценивали их разнообразие.

Результаты исследований

При выборе источника БПС для последующей инкорпорации в защитную пленку в предварительных опытах использовали три группы микробных продуцентов бактерицидных веществ – *B. circulans*, *P. polymyxa* и *E. faecium*, а также препарат низин

(Sigma). В этих экспериментах в качестве тест-объектов применяли смесь микроорганизмов, выделенной с поверхности ослизненной коммерческой сосиски. Данная смесь, как показал бактериологический анализ, включала различные по размеру и окраске по Граму кокковые и бациллярные формы микроорганизмов. Взвесь смеси указанных микроорганизмов высевали на ГРМ-агар в чашках Петри и сразу же на газон наносили (по 10 мкл) БПС исследуемых штаммов, а также бактериоцин низин.

На рисунке 2 приведены фрагменты чашки Петри, где расположены типовые зоны ингибирования смеси микроорганизмов на примере БПС штамма 1969 *B. circulans* и низина. Как видно из представленных данных, БПС штамма 1969 в пределах ее диффузии на поверхности питательной среды полностью подавляет рост смеси микроорганизмов – т.е. дает «чистую» зону ингибирования. Низин менее активен, поскольку в зоне его нанесения наблюдается рост кокковых форм микроорганизмов.

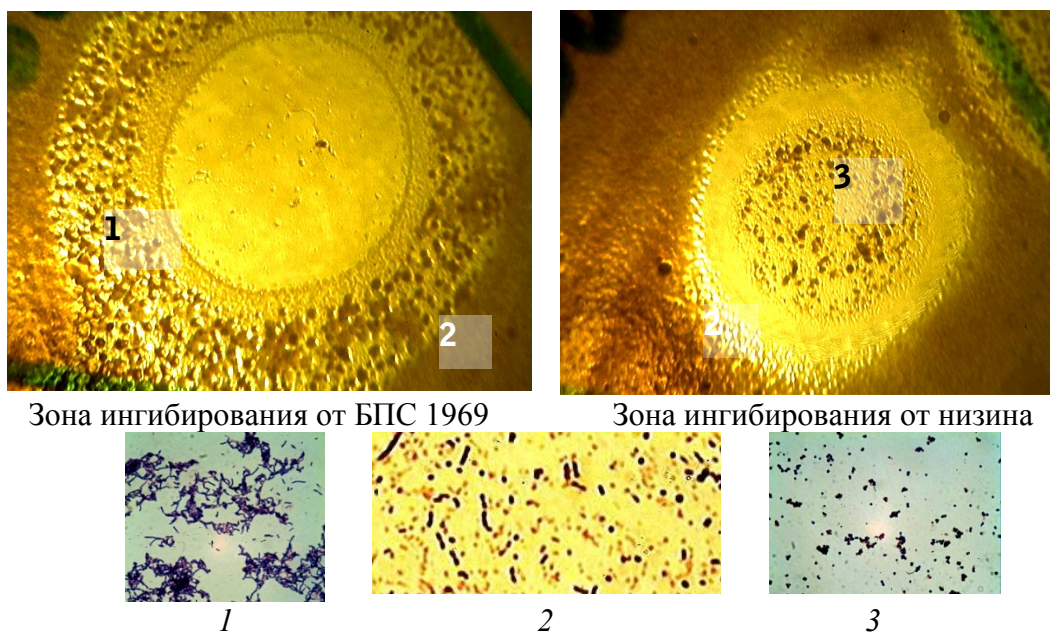


Рисунок 2. Зоны ингибирования смешанного газона культур, вызвавших ослизнение поверхности сосисок, при нанесении БПС *B. circulans* 1969 и низина.

В нижем ряду - микроскопия мазков: 1 – зоны частичного подавления роста смешанного газона (обнаруживаются Гр+ бациллы); 2 – пограничной зоны, разделяющей участки частичного проявления эффекта ингибирования и полного его отсутствия (видны Гр+ бациллы, кокки и грамотрицательные формы клеток); 3 – зона неполного ингибирования (видны крупные Гр+ кокки).

В целом указанный пример отразил действие других исследованных БПС на смесь микроорганизмов. Так, характер действия бактериоцина 33.22 *E. faecium* был подобен низину, тогда как всех штаммов *B. circulans* – аналогичен БПС 1969. Промежуточное положение по ингибирующему эффекту, но превосходящее низин, занимала БПС *P. polytuxa* 602.

Далее, исходя из полученных результатов, использовали штаммы *B. circulans* и *P. polymyxa* 602. Культивирование всех штаммов бацилл в разработанной минерально-глицериновой питательной среде при температуре 29-30° С обеспечивало накопление в БПС на уровне 100-200 АЕ/мл (рисунок 3а). Такой уровень выхода антимикробного вещества позволял непосредственно использовать бесклеточный супернатант для приготовления опытных образцов пленкоформирующего покрытия (рисунок 3б). Увеличение диаметра зон ингибирования роста тест-штамма от раствора полимера с бактерицидным веществом по сравнению с исходным БПС связано с различиями в объеме нанесенных проб (50 мкл вместо 10 мкл). Сам же раствор полимера никакой активности в отношении тестового штамма *E. coli* R3 не проявлял (рисунок 3б, Контр).

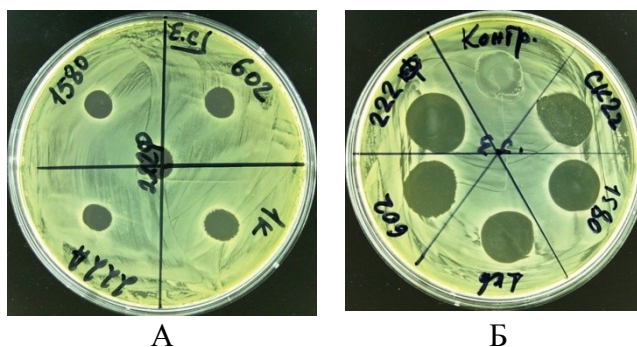




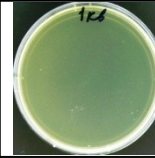
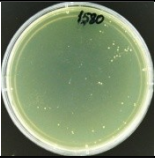
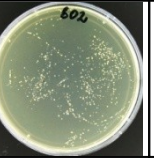
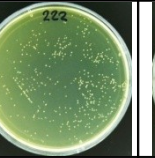

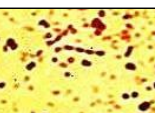
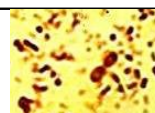
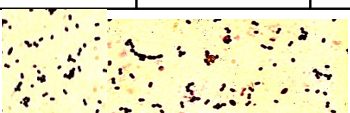
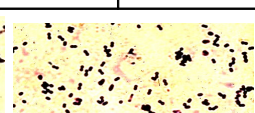
Рисунок 3. Активности исходных образцов бесклеточного супернатанта бацилл и приготовленных на их основе растворов поливинилового спирта в отношении *E. coli* R3. А - Бактерицидная активность исходных супернатантов (образцы наносили по 10 мкл на газон). Б - Бактерицидная активность супернатантов с 10% ПВС (образцы наносили по 50 мкл на газон; Контр. – контроль: 10% ПВС в воде). 1Кв, 1580, Ск2ч, В- 222 (а, ф) – штаммы *B. circulans*; 602 - *P. polymyxa*.

Установили, что полученные растворы полимера с бактерицидными веществами выдерживают автоклавирование (0,5 ати, 20 мин) и последующее хранение при комнатной температуре в течение месяца без заметных потерь в активности.

Приготовленные и проверенные на бактерицидную активность растворы полимера использовали для обработки срезов сосисок (рисунок 1). Данные по спонтанной обсемененности 5 суточных проб представлены в таблице 1. Хранение образца сосисок в нативном виде - без нанесения на ее поверхность поливинилового покрытия с бактерицидным веществом, как видно из данных таблицы 1 (см. контроль 2), приводит к размножению на поверхности различных видов микроорганизмов, включая бациллы и дрожжи. Несколько лучше картина по микробному пейзажу для образца, покрытого только водным раствором ПВС (контроль 1) – бациллярных форм становится меньше.

Таблица № 1

Показатели общей микробной обсемененности образцов срезов сосисок с бактерицидными покрытиями и без них после 5 суток хранения при комнатной температуре

Данные по микробной обсемененности (КОЕ/мл) образцов и типам контаминантов							
Контроль 1	Контроль 2	1 Кв*	1580*	602**	222*	Ск2ч*	
							
>>10000	>> 10000	48±17	60±22	511±86	426±107	310±65	
							
Контроль 1 – пленка без БПС; Контроль 2 – без пленки и БПС; (*) БПС на основе шт. <i>B. circulans</i> ; (**) БПС на основе шт. <i>P. polymyxa</i>							

В тоже время использование БПС, продуцируемых антагонистически активными штаммами *B. circulans* и *P. polymyxa*, в составе защитных пленок на основе ПВС обеспечивает существенное (в сотни раз) снижение как общей микробной обсемененности сосисок в процессе хранения, так и разнообразия контаминантов. На поверхности сосисок, например, не обнаруживаются бациллярные формы, которые являются ключевыми агентами порчи продуктов питания [4].

Экспериментальные образцы различались лишь по количеству контаминантов из числа весьма схожих по морфологии кокковых форм микроорганизмов (таблица 1). Особенно заметно это было после 10 суток хранения второй серии сосисочных проб (таблица 2).

Таблица № 2

Показатели общей микробной обсемененности образцов срезов сосисок с бактерицидными покрытиями и без них после 10 суток хранения при комнатной температуре (обозначения, что и в таблице 1).

Данные по микробной обсемененности (КОЕ/мл) образцов						
Контроль 1	Контроль 2	1 Кв*	1580*	602**	222*	Ск2ч*
>>10000	>> 10000	520±64	450±82	2500±314	~4500	430±51

Из сравнительного анализа полученных данных следует, что лучшими показателями по сдерживанию нарастания микроорганизмов на поверхности мясосодержащего продукта обладают полимерные покрытия с БПС на основе штаммов Ск2ч *B. circulans* (уменьшают микробную обсемененность в 1,4 раза), 1580 *B. circulans* (уменьшают микробную обсемененность в 7,5 раза) и 1 Кв *B. circulans* (уменьшают

микробную обсемененность в 13 раз). Худшие результаты получены с применением бактерицидных продуктов штамма 602 *P. polymyxa* и штамма 222 *B. circulans* (таблица 2).

Таким образом, наблюдаемые эффекты являются следствием активности бактериоциноподобной субстанции, которая способна беспрепятственно диффундировать из полимерной пленки и оказывать ингибирующее действие в отношении ключевых бактерий, вызывающих порчу сосисок и потенциально других мясных продуктов.

Выводы

Одной из известных проблем связанных с порчей мясных продуктов является ослизнение, которое вызывается ростом психро-, мезо- и термофильных микроорганизмов. Применяемые для борьбы с этим явлением химические реагенты (органические кислоты, соли, антиоксиданты и др.), равно как и антибиотики, не в полной мере отвечают условиям, предъявляемым к качеству питания.

Проведенные исследования показали потенциальную возможность практического использования бактериоцинов и бактериоциноподобных субстанций, выделяемых из некоторых видов бацилл, в составе полимерных пленок с целью снижения уровня микробной контаминации пищевых продуктов.

Эффективность антимикробных полимерных покрытий, получаемых с применением бактериоцинов и бактериоциноподобных субстанций - группы антибиотических веществ естественного происхождения, зависела от свойств продуцента и это позволяет выбрать наиболее перспективные штаммы для дальнейших исследований в данном направлении.

Литература

1. Siragusa, G.R., Cutter, C.N. and Willett, J.L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat // Food Microbiology, 1999. – 16. – P. 229-235.
2. Cutter C.N., Willet J.L. and Siragusa G.R. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator // Letters in Applied Microbiology, 2001. – 33. –P. 325-328.
3. Claus, D. and Berkely, R. C. W. Genus Bacillus Cohn 1872, 174AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984. - Vol. 2, ed. by Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1105–1139.
4. Abriouel H., Franz C.M.A.P., Omar N.B. & Galvez A. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins // FEMS Microbiol. Rev., 2011. – 35. P. 201–232.

5. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения // Электронный научный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ» <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>. - С. 164 - 198.
6. Todar K. Электронная версия <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> © 2009 Kenneth Todar, PhD.
7. Иваненко А.А., Сафонов В.С., Змеева Н.Н., Чурбанов В.Г., Саитова Н.А. Способ получения бактериального ферментного препарата пектин-лиазы. Патент РФ № 2252959. Опубликовано: 27.05.2005. - Бюл. № 15. - 7с.
8. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта // Успехи химии, 1998. - 67 (7). – С. 641 – 655.
9. Ефременко Е.Н., Татаринова Н.Ю. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов // Микробиология, 2007. - Том 76, № 3. - С. 383-389.
10. Храмов В.М., Калмантаев Т.А., Чукина И.А., Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Поиск антагонистически активных энтерококков, получение и свойства синтезируемых ими бактерицидных веществ // В мире научных открытий, 2010. - №5 (11), часть 4. – С. 41 – 46.