



УДК 664.8/9:579.67:579.852.11

Г.В. КАЛМЫКОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Л.И. БУРЦЕВА*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
О.Г. ЕРМАКОВА**, врач-бактериолог,
О.Ю. ЯКУНИНА**, заведующая лабораторией,
К.Я. МОТОВИЛОВ, доктор биологических наук, заведующий лабораторией

ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт переработки
сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии,

*Учреждение Российской Академии наук Институт систематики и экологии животных
Сибирского отделения РАН,

** ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области
e-mail: gvkalmlyk@mail.ru

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методом спот-теста проведен скрининг 34 штаммов *Bacillus thuringiensis* (Bt), относящихся к 22 подвидам, и двух штаммов *B. cereus* по способности ингибировать рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, нормируемых в качестве показателей безопасности пищевых продуктов. Выявлена способность ряда штаммов группы *B. cereus-thuringiensis* синтезировать антибактериальные вещества, активные против санитарно-показательных микроорганизмов, выделенных из различных пищевых продуктов и смывов с оборудования предприятий общественного питания. Отобрана коллекция культур микроорганизмов (*Bacillus cereus*, *Bt* ssp. *thuringiensis*, *Bt* ssp. *dakota*, *Bt* ssp. *toumanoffi*, *Bt* ssp. *yupanensis*), активных в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, контроль которых предусмотрен СанПиН 2.3.2.1078–01. Предполагается дальнейшее изучение выбранных культур в качестве продуцентов бактериоцинов – антимикробных веществ, которые потенциально могут использоваться как натуральные пищевые консерванты, а также в качестве альтернативного метода контроля болезней людей и животных.

Ключевые слова: штаммы *Bacillus thuringiensis*, антибактериальная активность, бактериоцины.

Одна из задач пищевой промышленности – обеспечение безопасности пищевых продуктов, которая определяется гигиеническими нормативами в отношении санитарно-показательных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [1]. Также актуален вопрос продления сроков годности пищевых продуктов.

К веществам, способствующим увеличению сроков годности, традиционно относятся консерванты. Однако искусственные консерванты, которые используют в пищевой промышленности, несут определенные риски для здоровья людей, поэтому предлагается заменять потенциально вредные искусственные ингредиенты на безопасные природные компоненты [2]. Значительный интерес представляет использование в качестве натуральных пищевых консервантов бактериоцины – рибосомально синтезируемые пептиды, или белки с антимикробной активностью, продуцируе-

мые различными группами бактерий. Очень важно, что бактериоцины или бактериоциноподобные ингибиторные вещества чувствительны к протеолитической деградации в желудочно-кишечном тракте человека, следовательно, имеют минимальные риски для здоровья людей [3]. Их потенциальное применение в пищевой промышленности и медицине привлекает внимание как ученых, так и производителей. В настоящее время бактериоцины рассматривают как альтернативу традиционным антибиотикам в медицине и ветеринарии, химическим консервантам в пищевой промышленности, химическим препаратам против болезней растений в сельском хозяйстве, а также в качестве стимуляторов роста растений.

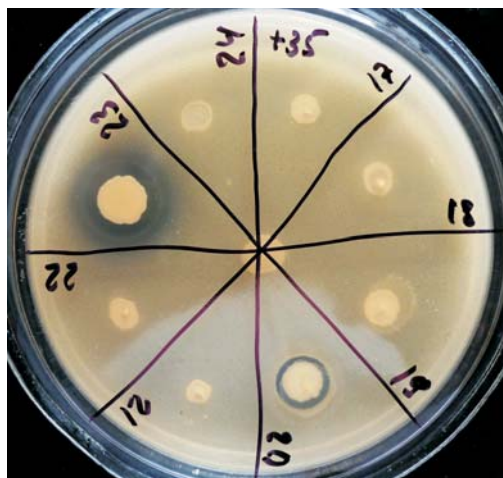
Бактериоцины синтезируются различными группами бактерий, но большинство исследований, касающихся их пищевого применения, фокусируется на бактериоцинах лактобактерий, главным образом, низине [4]. Его используют как пищевой биоконсервант в частично очищенном виде более 50 лет. Однако применение низина ограничено из-за активности лишь против грамположительных бактерий [5], низкой эффективности при нейтральных и щелочных значениях pH и резком снижении активности под действием ферментов пищевого сырья [6]. Кроме того, существует ряд факторов, ограничивающих применение бактериоцинов лактобактерий в промышленном масштабе. Эти трудности связаны с их культивированием, технологией получения частично очищенных бактериоцинов и, как следствие, с высокой стоимостью их производства. В связи с этим поиск простых в культивировании продуцентов новых бактериоцинов с улучшенными физико-химическими свойствами (стабильность в широком диапазоне pH и температур), а также с широким антимикробным спектром представляет большой интерес.

Бактерии рода *Bacillus* включают в себя промышленно важные виды, которые имеют длительную историю безопасного применения в медицине, пищевой и легкой промышленности, сельском хозяйстве, во многих других отраслях народного хозяйства. *Bacillus thuringiensis* (Bt) используют как безопасный биоинсектицид во всем мире с середины XX в. [7]. За последние несколько лет появился ряд работ о способности этих культур синтезировать бактериоцины [2, 8–15].

Цель данной работы – поиск штаммов *Bacillus thuringiensis*, способных ингибировать рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, контроль которых предусмотрен гигиеническими нормативами по микробиологическим показателям безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данной работе в качестве потенциальных продуцентов бактериоцинов оценены 34 штамма *Bt*, относящихся к 22 подвидам, и два штамма *B. cereus* из коллекции лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН. В качестве индикаторных штаммов проверены 22 культуры: типовые штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Micrococcus lysodeikticus*, а также штаммы *Salmonella enteritidis*, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Serratia fonticola*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, вы-



Антибактериальная активность штаммов *Bt* против индикаторного штамма *E. coli*

деленные из различных пищевых продуктов или смывов на объектах предприятий общественного питания.

Скрининг штаммов с антибактериальной активностью проводили на среде «А» (0,7 % пептона, 0,5 % NaCl, 0,4 % рыбный гидролизат, 1,2 % агар-агара) методом спот-теста против грамотрицательных штаммов и грамположительных бактерий. В 100 мл расплавленной агаризованной среды «А» вносили 1 мл 16-часовой культуры тест-микроорганизма ($\sim 10^9$ кл/мл), тщательно перемешивали и разливали по 25 мл в стерильные чашки Петри. Посев штаммов – потенциальных продуцентов бактериоцинов – проводили уколом. Культуры выращивали при 30 °С. Антибактериальную активность учитывали по образованию зоны ингибирования роста вокруг колоний через 24 ч (см. рисунок).

Коэффициент подавления роста индикатора (Кп) рассчитывали как отношение диаметра зоны отсутствия роста индикаторной культуры Дз (мм) и диаметра макроколонии штамма Дк (мм): $K_p = D_z/D_k$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Испытанные в качестве индикаторных культур грамотрицательные штаммы *S. enteritidis*, *S. anatum*, *Shigella flexneri*, *Serratia fonticola*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, один из двух проверенных штаммов *Proteus mirabilis* и два из четырех проверенных штаммов *E. coli* оказались нечувствительными ко всем проверенным культурам группы *Bacillus cereus-thuringiensis*. Из всех тестируемых штаммов 41,7 % подавляли рост пяти грамположительных штаммов *St. aureus*, шесть штаммов ингибировали рост штамма 504 *B. cereus*. Наибольшую чувствительность к бактериям группы *Bacillus cereus-thuringiensis* проявил грамположительный штамм *Micrococcus lysodeikticus*. Из 36 проверенных штаммов 50 % подавляли его рост (табл. 1). В целом можно отметить, что грамположительные индикаторные культуры более чувствительны к штаммам группы *Bacillus cereus-thuringiensis*, чем грамотрицательные.

Таблица 1
Антибактериальная активность штаммов группы *Bacillus cereus-thuringiensis* против условно-патогенных и патогенных культур, определенная спот-тестом

Штаммы-продуценты		Число чувствительных штаммов/число проведенных штаммов	Индикаторные штаммы					
Видовое определение	Шифр		Грамотрицательные		Грамположительные			
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>B. cereus</i> ssp.	504	11/20	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> ssp.	274	5/19	+	-	-	+	+	-
<i>Bt</i> ssp. <i>thuringiensis</i>	221	11/20	+	+	+	+	+	+
<i>Bt</i> ssp. <i>thuringiensis</i>	213	10/20	+	+	+	+	+	+
<i>Bt</i> ssp. <i>sumiyoshiensis</i>	84F5146	2/11	+	-	-	-	-	+
<i>Bt</i> ssp. <i>fukuokaensis</i>	84I-1-13	2/19	+	-	-	-	+	-
<i>Bt</i> ssp. <i>sotto</i>	617	2/19	-	-	-	+	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>galleriae</i>	P2	1/9	-	-	-	+	-	+
<i>Bt</i> ssp. <i>subtoxicus</i>	206	2/19	+	-	-	-	+	-
<i>Bt</i> ssp. <i>entomocidus</i>	201	4/19	+	-	+	+	-	+
<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i>	212	0/19	-	-	-	-	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>morrisoni</i>	209	1/19	-	-	-	-	+	-
<i>Bt</i> ssp. <i>morrisoni</i>	PG-14	2/19	+	-	-	+	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>morrisoni</i>	109	0/19	-	-	-	-	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>darmstadiensis</i>	73E10-16	2/19	+	-	-	+	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>darmstadiensis</i>	73E10-2	2/19	+	-	-	+	-	-
<i>Bt</i> ssp. <i>toumanoffi</i>	272	9/19	+	+	+	+	+	-
<i>Bt</i> ssp. <i>israelensis</i>	1125	3/8	+	-	-	-	-	-

Примечание. « + » — чувствительные индикаторные культуры; « - » — устойчивые индикаторные культуры

Большинство проверенных штаммов *Bt* проявляли антибактериальную активность как в отношении грамположительных, так и отдельных грамотрицательных культур. Активность только против грамотрицательных культур показали штаммы *Bt* ssp. *israelensis* (см. табл. 1).

Наиболее широкий спектр активности проявляли штамм 504 *B. cereus*, два штамма *Bt* ssp. *thuringiensis*, два штамма *Bt* ssp. *dakota*, штамм 272 *Bt* ssp. *toumanoffi* и штамм 1204 *Bt* ssp. *yunanensis*. Они ингибировали рост половины и более индикаторных штаммов – как грамотрицательных, так и грамположительных (см. табл. 1).

Хотя штаммы *Bt* ssp. *thuringiensis* различались по способности продуцировать кристаллический дельта-эндотоксин, спектр их активности в отношении проверенных тест-культур совпадал. Эти штаммы находились в числе немногих, которые ингибировали рост *B. cereus*. Кроме них штамм 504 *B. cereus* был чувствителен к культурам *Bt* ssp. *sumiyoshiensis*, *Bt* ssp. *galleriae*, *Bt* ssp. *entomocidus* и *Bt* ssp. *neoleonensis*. Одинаковый спектр действия был и у двух штаммов *Bt* ssp. *dakota*. Из трех проверенных культур *Bt* ssp. *yunanensis*, которые, как и штаммы *Bt* ssp. *thuringiensis*, различались по способности кристаллообразования, только штамм 1204 *Bt* ssp. *yunanensis* проявлял антибактериальную активность в отношении широкого ряда тест-культур.

Для четырех штаммов *Bt* с широким спектром антагонистического действия определены коэффициенты подавления роста индикаторов штаммов (табл. 2). Между штаммами отмечены как различия по спектру антибактериальной активности, так и по уровню синтеза антибактериальных веществ (см. табл. 2, рисунок).

О том, что штаммы *Bt* обладают антибактериальной активностью в отношении близкородственных бактерий, известно давно [16]. Французские исследователи сообщили, что ингибирующее действие штаммов *Bt* на размножение других бактерий одновременно выявлено в 1957 г. М. Ванковой в Чехословакии и Н.А. Красильниковым, А.Б. Гукасян в СССР [16]. В ряде последних работ показано, что эта активность связана с синтезом бактериоцинов или бактериоциноподобных веществ [2, 8–15]. Охарактеризовано несколько бактериоцинов, продуцируемых штаммами *Bt* ssp. *kurstaki*, *Bt* ssp. *entomocidus* [10, 11] и бактериоциноподобных веществ, продуцируемых культурами *Bt* ssp. *thuringiensis*, *Bt* ssp. *tochigiensis*, *Bt* ssp. *morrisoni*, *Bt* ssp.

Таблица 2

Подавление роста индикаторных культур штаммами-продуцентами

Индикаторный штамм	Коэффициент подавления роста индикаторов штаммами <i>Bacillus</i> , Кп = Дз/Дк*			
	<i>Bt</i> ssp. <i>thuringiensis</i> 221	<i>Bt</i> ssp. <i>yunanensis</i> 1204	<i>Bt</i> ssp. <i>dakota</i> 1199	<i>Bt</i> ssp. <i>toumanoffi</i> 272
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,2 ± 0,4
<i>St. aureus</i>	1,4 ± 0,2	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,5
<i>B. cereus</i>	2,3 ± 0,6	0	0	0
<i>E. coli</i>	1,7 ± 0,4	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3
<i>S. typhimurium</i>	1,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2

* Коэффициент подавления роста индикаторных культур рассчитывали по трем повторностям.

kenyae, *Bt* ssp. *tolworthi* [2, 13, 14]. Наши исследования показали способность штаммов *Bt* ssp. *thuringiensis* подавлять рост грамотрицательных и грамположительных бактерий. Проверенные штаммы *Bt* ssp. *entomocidus* проявляли ингибирующую активность в отношении некоторых тестируемых штаммов. Выявлена антибактериальная активность у двух из трех исследованных штаммов *Bt* ssp. *morrisoni*. Ранее мы показали, что штаммы шести морфов *Bt* ssp. *kurstaki* различались способностью к синтезу бактериоциноподобных веществ [7]. В данной работе выявлены штаммы с широким спектром антибактериальной активности, относящиеся к *Bt* ssp. *dakota*, *Bt* ssp. *toumanoffi*, *Bt* ssp. *yunnanensis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате работы отобрана коллекция штаммов *Bt* нескольких подвидов с выраженной антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов, контроль которых предусмотрен СанПиН 2.3.2.1078–01. Эти штаммы могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве продуцентов бактериоцинов – потенциальных био-консервантов пищевых продуктов. Кроме того, поскольку один из путей попадания патогенных микроорганизмов в пищевые продукты – от больных животных, то, вероятно, выделенные бактериоцины могут использоваться для лечения в ветеринарии, что уже рассмотрено в работе [17]. Также эти вещества можно применять как альтернативу антибиотикам для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта людей, вызванных приемом инфицированных патогенными микроорганизмами пищевых продуктов [18]. Различия штаммов по спектру действия могут быть использованы при разработке на их основе препаратов избирательного действия.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. СанПиН 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М., 2002.
2. Barboza-Corona J.E., Vazquez-Acosta H., Bideshi D.K. et al. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* // Arch. Microbil. – 2007. – Vol. 187. – P. 117–126.
3. Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C. et al. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 98. – P. 1316–1325.
4. Delves-Broughton J. Nisin and its use as a food preservative // Food Technol. – 1990. – Vol. 44. – P. 100–117.
5. Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. Synergistic antimicrobial effect of nisin and cymene on *Salmonella enterica* serovar *typhi* in vitro and ready-to-eat food // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2010. – Vol. 74. – P. 520–524.
6. Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M. et al. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A // Microbiology. – 1997. – Vol. 143. – P. 2287–2294.
7. Бурцева Л.И., Штерншис М.В., Калмыкова Г.В. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. – М.: Издат. дом «Круглый год», 2001. – 725 с.
8. Gray E.J., Lee K.D., Souleimanov A.M. et al. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB 17: isolation and classification // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 545–554.
9. Kamoun F., Mejdoub H., Aouissaoui H. et al. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 98. – P. 881–888.

10. Jung W.-J., Mabood F., Souleimanov A. et al. Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp.*kurstaki* // J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 18. – P. 1836–1840.
11. Cherif A., Chehimi S., Linem F. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9 // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 990–1000.
12. Chehimi S., Delalande F., Sable S. et al. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* // Can. J. Microbiol. – Vol. 53. – P. 284–290.
13. Favret M.E., Yousten A.A. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* // J. Invertebr. Pathol. – 1989. – Vol. 53. – P. 206–216.
14. Paik H.D., Bae S.S., Park S.H. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp.*tochigiensis* // J. Industrial Microbiol. & Biotechnol. – 1997. – Vol. 19. – P. 294–298.
15. Cherif A., Ouzari H., Daffonchio D. et al. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil // Lett. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 32. – P. 243–247.
16. De Barjac H., Lajudie J. Mise en évidence de facteurs antagonistes du type des bacteriocines chez *Bacillus thuringiensis* // Annales De Microbiologie. – 1974. – Vol. 125 B, N 4. – P. 529–537.
17. Barboza-Corona J.E., de la Fuente-Salcido N., Alva-Murillo N. et al. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovin mastitis // Veterinary Microbiol. – 2009. – Vol. 138. – P. 179–183.
18. Rea M.C., Sit C.S., Clayton E. et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile* // PNAS. – 2010. – Vol. 107. – P. 9352–9357.

Поступила в редакцию 09.02.2012

G.V. KALMYKOVA, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
L.I. BURTSEVA*, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
O.G. ERMAKOVA**, Bacteriologist,
O.YU.YAKUNINA**, Laboratory Head,
K.YA. MOTOVILOV, Doctor of Science in Biology, Laboratory Head

Siberian Research Institute of Agriproducts Processing,
Russian Academy of Agricultural Sciences,
*Institute of Systematics and Ecology of Animals,
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
**Centre of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region
e-mail: gvkalmky@mail.ru

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS AGAINST PATHOGENIC AND CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS

Using an agar spot test, 34 *Bacillus thuringiensis* strains of 22 subspecies and two *B. cereus* strains were screened for antibacterial activity against pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms regarded as indices of food safety. Here we report the production of antibacterial substances by *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains capable to inhibit the growth of sanitary-revealing microorganisms isolated from different food products. Set of strains (*Bacillus cereus*, Bt ssp. *thuringiensis*, Bt ssp. *dakota*, Bt ssp. *toumanoffi*, Bt ssp. *yunnanensis*) active against gram-negative and gram-positive bacteria of the SANPIN 2.3.2.1078-01 sanitary inspection microorganisms was selected. Due to their ability, these strains are of great value to be used in food preservation and also for controlling human and animal diseases.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* strains, antibacterial activity, bacteriocins.