

УДК 579:577.112.6

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

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии  
(пос. Оболенск, Серпуховский р-н, Московская область, Россия)

## БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНОЕ ВЕЩЕСТВО *Bacillus circulans* И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Исследования выполнены при финансовой поддержке ФЦП  
«Национальная система химической и биологической безопасности РФ»  
на 2009–2013 гг. (ГК № 122-Д и 55-Д).

Исследована зависимость выхода бактериоциноподобного антимикробного вещества, синтезируемого штаммом *Bacillus circulans* Ск2ч в процессе глубинного культивирования, от вида источника азота и углерода в питательной среде. Показано, что это вещество начинает накапливаться в культуральной жидкости после 18 ч роста при 30°C, достигая максимальных значений после 2 сут инкубации штамма, когда в клетках еще не заметны признаки спорообразования. Для его выделения из культуральной жидкости наиболее эффективным оказался метод двухфазного разделения с применением органического растворителя дихлорметана. Установлено, что за проявление антимикробной активности бактериоциноподобного вещества отвечает пептид с молекулярной массой 5–6 кДа.

**Ключевые слова:** микроорганизмы; бактериоцины и бактериоциноподобные вещества; антимикробная активность.

### Введение

За последние 30 лет было выделено множество разнообразных антибиотикорезистентных микроорганизмов, на которых не действует большинство известных антибиотиков, поэтому поиск новых антибактериальных веществ с меньшей степенью привыкания к ним возбудителей болезней, чем у классических антибиотиков, является актуальной задачей. Достаточно обширным, но еще малоизученным источником получения такого рода средств имеют представители аэробных спороформирующих бацилл [1].

Микроорганизмы рода *Bacillus* способны синтезировать антибиотики и биосурфактанты [2, 3], бактериоцины и бактериоциноподобные субстанции [1]. Антимикробную активность бацилл чаще связывают с представителями кластера видов *circulans-polymyxa* [4, 5]. Длительное время считалось, что антимикробные свойства этой группы бацилл обусловлены в основном продукцией пептидных антибиотиков широкого спектра действия [5], которые способны подавлять не только различные грамположительные и грамотрицательные бактерии, но и патогенные грибы *Candida albicans* [6, 7]. Однако еще в 1998 г. Puiri et al. [8] из *Paenibacillus polymyxa* выделили новую неиз-

вестную ранее бактериоциноподобную субстанцию с молекулярной массой около 10 кДа, которая не была классическим антибиотиком полимиксином, но ингибировала рост как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов. Она имела пептидную природу, была термостабильна, нечувствительна к органическим растворителям, хелаторам, к кислым значениям pH, но разрушалась в щелочных условиях. В последующем факт синтеза *P. polymyxa* бактериоцинов класса I (лантибиотики по Kleienhammer) был подтвержден сотрудниками Университета штата Огайо [9]. Способность к продукции бактериоцинов была обнаружена и среди представителей *B. circulans* [10]. Так, при определенных условиях выращивания штамм *B. circulans* 1580 был способен синтезировать бактериоцин с молекулярной массой 3,9 кДа [10], но технология его извлечения не отработана. Показана способность выделенных из природы штаммов *B. circulans* к росту в растительных отварах с одновременным накоплением антимикробных веществ широкого спектра антимикробного действия [11]. Активности получаемых при этих условиях ферментатов были невысоки, поскольку ни среды, ни условия культивирования этих микроорганизмов специально не подбирались.

При выборе штамма-продуцента полезных веществ серьезное внимание уделяется его безвредности. Известно, что бактерии группы *B. circulans* безвредны для животных и растений [12]. Они обнаруживаются в пищеварительном тракте насекомых [13], кишечнике грызунов и насекомыхных животных [14], вместе с другими почвенными бациллами ускоряют процессы минерализации органического вещества [15], стимулируют микробную ризосферу [16]. На основе *B. circulans* выпускается биопрепарат калиплант, который ускоряет рост культурных растений [17], а также ферментный препарат для мацерации кормов животных [18].

Целью данной работы было исследование факторов, влияющих на продукцию штаммом *B. circulans* бактериоциноподобного вещества и выбор способа его выделения для последующего изучения.

### Материалы и методики исследования

**Объект исследования.** В работе использован выделенный из настоя соломы штамм Ск2ч, который по совокупности морфокультуральных и биохимических (API 50 CHB, BioMerieux) свойств был идентифицирован как *Bacillus circulans* П. Штамм хранится в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» (регистрационный № 6861).

**Питательные среды и условия культивирования.** Размножение клеток штамма осуществляли на питательном агаре (Nutrient Agar M001, HiMedia, India; Starch agar, Ref.1-283, Scharlau, EU; ГРМ агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия) при 30°C в течение 2 сут. Первичное пассирование клеток штамма осуществляли в аналогичных условиях.

В опытах по глубинному культивированию одиночные типовые колонии штамма переносили в пробирку со стерильным изотоническим раствором хлористого натрия (физраствор) и суспендировали с использованием встряхивателя BioVortex V1 («Biosan», СС), ориентируясь на получение 1 млрд взвеси клеток/1 мл по стандарту мутности Л.И. Тарасевича. Микробной взвесью (1%, объем/объем) засеивали качалочные колбы (объем 750 мл) со 100 мл питательных сред. За основу питательных сред была взята пропись в составе (г/л): дрожжевой экстракт – 5,0; калия фосфат двухзамещенный трехводный – 3,0; натрия хлорид – 1,0; калия хлорид – 1,0 и магния сульфат – 0,005 (рН 7,3–7,5).

На первом этапе исследований к основе среды отдельно (по 0,5%) добавляли различные источники азота: виннокислый аммоний, сульфат аммония, хлористый и щавелевокислый аммоний, солянокислый гидролизат казеина, панкреатический гидролизат рыбной муки (ППРМ), глутамат натрия и др. Во всех вариантах этих сред в качестве источника углерода использовали глюкозу ( $0,6 \pm 0,1\%$ ; вес/объем). Контролем был коммерческий ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия).

На втором этапе исследований в качестве питательной основы использовали пропись, выбранную по результатам первого этапа, с дополнительным введением вместо глюкозы других источников углерода – моно-, ди-, три-, олиго- и полисахаридов.

Инкубация всех вариантов посевов проводилась при 29–30°C в колбах на 750 мл со 100 мл среды в термостатируемой качалке («New Brunswick Scientific», USA) при 130 об./мин в течение 24–96 ч. В процессе инкубации отбирали пробы культуральной жидкости (КЖ), в которых определяли количество живых клеток (чашечный метод), начало образования спор (микроскопический метод) и синтеза бактерицидных веществ.

*Метод оценки антимикробной активности.* При определении бактерицидной активности пробы КЖ осаждали в микрофуге MiniSpain («Eppendorf AG 22232», Germany), освобождали от клеток и по 10 мкл наносили на свежезасеянные газоны тест-штаммов. С целью более точной оценки бактерицидной активности этих проб проводили их концентрирование методом выпаривания в анализаторе влажности MF-50 («Moisture Analyzer», Japan). Антагонистическая активность выражалась в арбитражных единицах (АЕ), отнесенных к 1 мл или 1 мг пробы: одна АЕ соответствовала максимальному разведению, при котором была заметна зона ингибирования тест-штамма.

*Методы получения антимикробного вещества.* Выделение грубых экстрактов бактериоциноподобного вещества (БПВ) с антимикробной активностью проводили из бесклеточного супернатанта и клеточной массы (КМ), которые получали центрифугированием КЖ при 8000 об./мин в течение 30 мин («Beckmann J2.2», Germany). При отработке способа выделения БПВ из супернатантов применяли методы солевой преципитации (сульфат аммония), сорбции на твердых носителях (силикагель, уголь, окись алюминия,

аэросил) с последующим элюированием с них, а также жидкостного разделения при помощи растворителей (дихлорметан, хлороформ, толуол) и концентрированием целевого вещества на границе раздела в интерфазную пленку (ИП). Осадки КМ вначале ресуспендировали добавлением в 400-миллиметровый центрифужный стакан по 1 мл физраствора, далее суспензию разводили 5 частями 80%-ного этанола (объем/объем) и после 30 мин перемешивания разделяли центрифугированием (4 000 об./мин, 10 мин).

Для удаления растворителей полученные образцы межфазных пленок и спиртовые элюаты досуха упаривали при нагревании до 105°C. Получаемые осадки с учетом их массы регидратировали в дистиллированной воде и сравнивали между собой по титру антимикробной активности. При этом исходные и серийно разведенные растворы БПВ наносили (по 10 мкл) на поверхность свежезасеянных газонов индикаторных грамотрицательных и грамположительных бактерий (в основном штаммы *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* соответственно).

Оценка молекулярной массы бактерицидного вещества проводилась с помощью метода электрофореза с додецилсульфатом натрия (DCH/SDS) в полиакриламидном геле (ПААГ/РААГ) в камере фирмы «Hofer» (США) по Шаггеру [19]. В качестве маркеров использовали фармакопейный инсулин («ОАО Национальные биотехнологии», п. Оболенск, Россия) и лизоцим гидрохлорид («Reanal», Hungary). В лунки подготовленного геля вносили исследуемые образцы и указанные маркеры (по 4 мкл). Концентрация разделяющего геля составляла 16,5%, концентрирующего – 10%. Форез вели в катодном (100 мМ Трис-НСl, 100мМ, 0,1% SDS, pH 8,25) и анодном (200 мМ Трис-НСl, pH 8,9) буферах в камере для вертикального электрофореза указанной фирмы при  $U = 125$  В и  $I = 25$  мА в течение 4 ч. Последующую фиксацию пептидов проводили в 5%-ном растворе глутарового альдегида в течение 30 мин с промывкой в дистиллированной воде. Окраску геля проводили в растворе, содержащем 25% этанола, 10% уксусной кислоты, 0,001% Кумасси G250 и воды (до 500 мл), в течение 30 мин. Гель далее отмывали в 10%-ном растворе уксусной кислоты при температуре 80°C в течение 2 ч и еще 30 мин – дистиллированной водой.

**Хроматография.** Для разделения БПВ по методу тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовались полоски (30 × 150 мм) алюминиевой фольги, покрытой силикагелем марки Silufol («Kavalier», Czechoslovakia) [16], на линию старта которых наносились пробы (по 4 мкл). Хроматографию проводили в системе растворителей: бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2,5) при комнатной температуре. Пластины высушивали, просматривали в ультрафиолете и, при необходимости, прокрашивали аэрозольным нанесением раствора нингидрина.

**Биотестирование активной фракции.** Биотестирование электрофоретически и хроматографически разделенных образцов БПВ осуществляли заливкой пластины ПААГ расплавленной агаровой взвесью или же накладкой

разрезанных на кусочки ( $1,5 \times 0,5$  см) хроматографических полосок на свежие газоны индикаторных культур в чашках Петри. После 6–18 ч инкубации посевов фиксировали наличие и места расположения зон ингибирования роста тест-штаммов.

### Результаты исследования и обсуждение

Было установлено, что при глубинном культивировании штамма *B. circulans* Ск2ч в питательных средах, различающихся по составу азот-содержащих соединений, уровень накопления БПВ был различен. Так, из данных табл. 1 видно, что если в качестве источника азота в составе среды использовались гидролизаты белков животного происхождения (казеин и рыбная мука), то БПВ не обнаруживалось, несмотря на весьма высокие показатели концентрации живых клеток ( $3\text{--}8 \times 10^8$  КОЕ/мл) в КЖ.

Такая же картина наблюдалась и при культивировании в бульоне с цитратом аммония, но уже в присутствии щавелевокислого и хлористого аммония антимикробная активность становилась заметной. Лучшие результаты по активности супернатантов давали среды, содержащие тиомочевину, мочевины, глутамат натрия, тартрат и сульфат аммония. На клетках одновременно сорбировалось вещество с более значительным эффектом на грамположительные бактерии, и этому в большей мере способствовало культивирование штамма в присутствии мочевины и глутамата (табл. 1). Дальнейшие исследования проводили в среде с тартратом, в присутствии которого результаты оказывались более стабильными. Простые моно- и дисахариды по способности влиять на синтез бактерицидного вещества были практически равнозначны (табл. 2). Из числа спиртов глицерин превосходил 1-, 2-пропандиол и немного уступал сахаридам. Частично гидролизированный полисахарид декстрин по спектру и величине активности оказался лучше декстрана, крахмала, целлюлозы и ее производных. Несмотря на то что в присутствии салицина и пектина наблюдался хороший рост клеток, это не способствовало накоплению бактерицидного вещества. Напротив, альгинат, лигнин и поливинилпирролидон на фоне весьма умеренного роста культуры стимулировали синтез антимикробианта. Среда с фиколлом и хитозаном не дали положительных результатов.

При глубинном культивировании в среде с виннокислым аммонием и глюкозой первые признаки спорообразования с агрегацией клеток отмечаются после 48 ч роста, а к 72 ч уже видны зрелые споры в спорангиях и остатки клеток (рис. 1). Достаточно сходная картина наблюдается и в опыте по культивированию штамма с другими вариантами питательных сред, которые содержали сульфат аммония и глутамат натрия. В этих условиях бактерицидное вещество на заметном уровне (100 АЕ/мл) появляется лишь после 18 ч роста, продолжая накапливаться в КЖ вплоть до 3 сут инкубации.

Таблица 1

**Антимикробные активности бесклеточных ферментатов и образцов  
бактериоциноподобного вещества из супернатантов и поверхности  
клеток в зависимости от источника азота в среде  
роста *B. circulans* Ск2ч *Listeria monocytogenes***

| Источник азота<br>в среде роста | Ферментаты<br>(АЕ/мл) |                         | БПВ из супернатанта<br>(АЕ/мл) |                         | БПВ из КМ<br>(АЕ/мл) |                         |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
|                                 | <i>E. coli</i>        | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i>                 | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i>       | <i>L. monocytogenes</i> |
| Аммония оксалат                 | Следы                 | НО                      | 50–100                         | НО                      | 50                   | НО                      |
| Аммония сульфат                 | 100–200               | 10–20                   | 1 600–3 200                    | 100–200                 | 800–1 600            | 3 200–6 400             |
| Аммония тартрат                 | 100–200               | 100                     | 1 600–3 200                    | 100–400                 | 1 600–3 200          | 1 600–6 400             |
| Аммония хлорид                  | 50                    | НО                      | 200–400                        | 50                      | 100                  | 200                     |
| Аммония цитрат                  | НО                    | НО                      | НО                             | НО                      | НО                   | НО                      |
| Казеина гидролизат              | НО                    | НО                      | НО                             | НО                      | НО                   | НО                      |
| Мочевина                        | 100                   | 10                      | 800–1 600                      | 400–800                 | 1 600                | 6 400                   |
| Натрия глутамат                 | 100–200               | 10                      | 400–1 600                      | 400–800                 | 1 600                | 6 400                   |
| Пептон мясной                   | НО                    | НО                      | НО                             | НО                      | НО                   | НО                      |
| Рыбной муки гидролизат          | НО                    | НО                      | НО                             | НО                      | НО                   | НО                      |
| Тиомочевина                     | 50–100                | НО                      | 800                            | 200–400                 | 800–1 600            | 3 200                   |
| ГРМ-бульон (контроль)           | НО                    | НО                      | НО                             | НО                      | НО                   | НО                      |

Примечание. НО – активность не обнаруживается.

Таблица 2

**Сравнение антимикробной активности супернатантов в зависимости  
от типа источника углерода в среде культивирования *B. circulans* Ск2ч**

| Источник<br>углерода | Активность (АЕ/мл) к |                         | Источник углерода                | Активность (АЕ/мл) к |                         |
|----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|
|                      | <i>E. coli</i>       | <i>L. monocytogenes</i> |                                  | <i>E. coli</i>       | <i>L. monocytogenes</i> |
| Глюкоза              | 100–200              | 50–100                  | Альгинат*                        | 100–200              | 10                      |
| Манноза              | 100–200              | 50–100                  | Декстрин                         | 100–200              | 100–200                 |
| Фруктоза             | 100–200              | 50–100                  | Декстран                         | 100                  | 10                      |
| Лактоза              | 100–200              | 50–100                  | Крахмал                          | 100                  | 10                      |
| Мальтоза             | 100–200              | 10–50                   | Целлюлоза МКЦ**                  | 200–400              | 10–50                   |
| Сахароза             | 100–200              | 50–100                  | Целлюлоза ТСХ***                 | 100–200              | 10–50                   |
| Салицин              | НО                   | НО                      | Целлюлоза,<br>гидроксиэтил. эфир | 100–200              | 10                      |
| Пропандиол           | 100                  | НО                      | Целлюлоза,<br>метилловый эфир    | 200–400              | 10–100                  |
| Глицерин             | 100–200              | 10                      | ПВП-10****                       | 100                  | 10                      |
| Фиколл Sigma         | 100                  | НО                      | Лигнин*****                      | 50–100               | 10                      |
| Пектин Nimedia       | 50–100               | НО                      | Хитозан щелочной                 | НО                   | НО                      |

\* Альгиновая кислота (Serva), нейтрализованная 10%-ным NaOH до значения pH 7,2;

\*\* микрокристаллическая, фармакопейная; \*\*\* для тонкослойной хроматографии;

\*\*\*\* поливинилпирролидон м.м. 10 000 (Sigma); \*\*\*\*\* в составе препарата «Полифепана» на основе лигнина – сорбента медицинского и ветеринарного назначения.

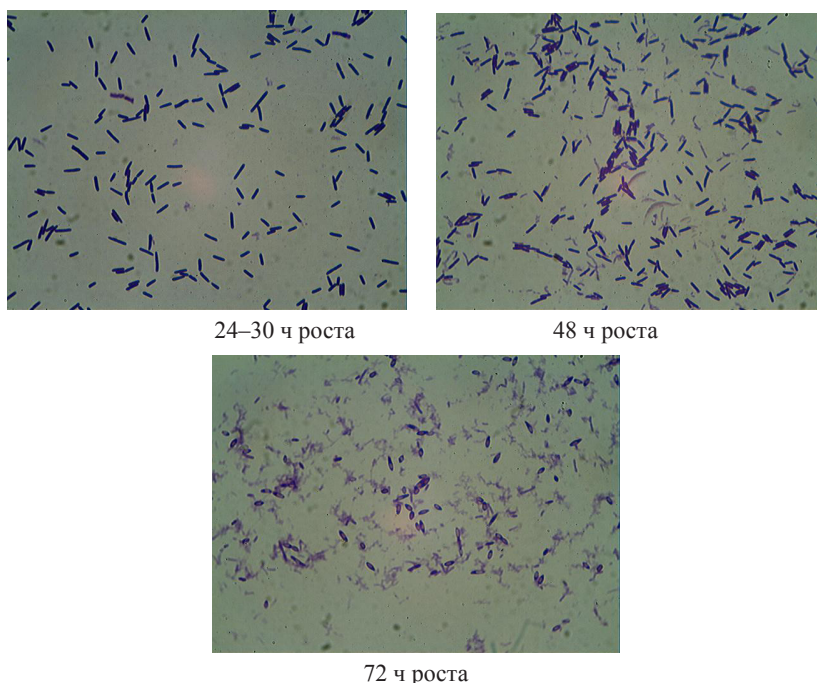


Рис. 1. Микроскопическая картина проб КЖ в процессе глубинного культивирования *B. circulans* Ск2ч в среде на основе тартрата аммония и глюкозы. Мазки окрашены по Граму, просмотрены при увеличении  $\times 1250$  в микроскопе модели Eclipse E200 («Nikon», China) под иммерсией и оцифрованы с помощью приставки Mini See 1,0 («Media Info V.0.7.36 Beta», СС

Результаты дальнейших исследований по выделению и количественной оценке бактерицидного вещества в некоторых вариантах питательных сред приведены в табл. 3. Как следует из представленных данных, все использованные нами полисахариды, кроме лигнина, способствовали продукции БПВ и даже, на первый взгляд, в большей степени, чем в контрольной среде с глюкозой. Анализ результатов этих опытов наводит на мысль о возможной солубилизирующей роли целлюлоз и альгината, так как их использование приводило к более высокому выходу бактерицидного вещества из супернатанта по сравнению с контролем. Об этом свидетельствует и характер распределения активности БПВ между клеточной массой КЖ и интерфазной пленкой, получаемой из бесклеточного супернатанта (табл. 4). Так, если в среде с глюкозой доля сорбированного на клетках бактерицидного вещества составляла 29%, то в средах с добавлением целлюлоз и альгиновой кислоты – от 1,5 до 13,5%. Полученные данные интересны тем, что демонстрируют пути увеличения выхода целевого продукта в жидкую фазу с использованием доступных материалов.

Как показали результаты электрофореза (рис. 2) и тонкослойной хроматографии образцов, расположение полос пептидов с активностью против тест-

штамма *E. coli* в контроле (рост на глюкозе) и в опыте при выращивании на различных типах целлюлозы практически одинаковое, что свидетельствует об их молекулярной идентичности. По данным биотестирования в опытах по ТСХ показатель  $R_f$  для всех образцов супернатанта был равен 0,7. Пептидные полосы БПВ из образцов супернатантов соответствовали молекулярной массе около 5,0–5,7 кДа (рис. 2). В то же время у контрольного образца, выделенного из клеточной поверхности продуцента, молекулярный вес активной фракции был несколько выше – около 6,0 кДа (образец 2, рис. 2).

Таблица 3

**Количественные показатели выхода бактериоциноподобного вещества *B. circulans* Ск2ч, выделенного методом двухфазного разделения после культивирования продуцента с полисахаридами**

| Источник углерода в питательной среде | Показатели бактериоцинсодержащей интерфазной пленки |                |                         |                         |                         |                       |                         |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                                       | Масса, мг                                           | АА* (АЕ/мг), к |                         | Суммарная АА (АЕ/мг), к |                         | Сравнение с контролем |                         |
|                                       |                                                     | <i>E. coli</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i>          | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i>        | <i>L. monocytogenes</i> |
| Альгиновая кислота                    | 30                                                  | 426            | 27                      | 12 780                  | 810                     | >3,2                  | >3,75                   |
| Глюкоза (контроль)                    | 54                                                  | 74             | 4                       | 3 996                   | 216                     | 1,0                   | 1,0                     |
| Лигнин                                | 8                                                   | 80             | 10                      | 640                     | 80                      | <6,24                 | <2,7                    |
| Метилцеллюлоза                        | 140                                                 | 69             | 2                       | 9 660                   | 280                     | >2,4                  | >1,3                    |
| Целлюлоза для ТСХ                     | 16                                                  | 320            | 40                      | 5 120                   | 640                     | >1,28                 | >2,96                   |
| Целлюлоза микрокристаллическая        | 26                                                  | 492            | 31                      | 12 792                  | 806                     | >3,2                  | >3,73                   |

\* Антимикробная активность.

Таблица 4

**Распределение антимикробной активности бактериоциноподобного вещества *B. circulans* Ск2ч между жидкой фазой и клетками в зависимости от углеводного состава ферментата**

| Источник углерода в среде роста | АА против <i>E. coli</i> (АЕ/мг) образцов БПВ из |       |         | Сорбировано на поверхности клеток, % |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|-------|---------|--------------------------------------|
|                                 | ИП                                               | КМ    | ИП + КМ |                                      |
| Альгиновая кислота              | 12 780                                           | 799   | 13 579  | 5,8                                  |
| Метилцеллюлоза                  | 9 660                                            | 789   | 10 449  | 7,5                                  |
| Микрокристаллическая целлюлоза  | 12 792                                           | 200   | 12 992  | 1,5                                  |
| Целлюлоза для ТСХ               | 5 120                                            | 800   | 5 920   | 13,5                                 |
| Глюкоза (контроль)              | 3 996                                            | 1 632 | 5 628   | 29,0                                 |

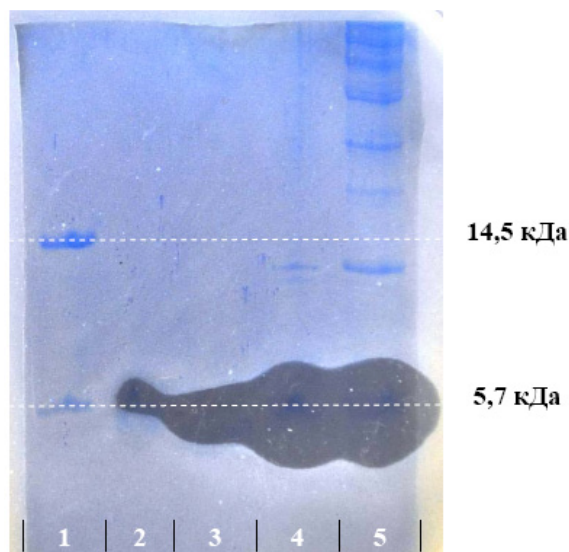


Рис. 2. Тестирование образцов бактерицидного вещества по данным ДСН-ПААГ электрофореза и определения величины молекулярного веса антимикробной фракции, действующего на штаммы *E. coli*: 1 – маркеры (5,7 и 14,5 кДа); 2 – контрольный образец (среда с глюкозой), выделенный из клеточной массы; 3 – то же из супернатанта; 4 – опытный образец из супернатанта, полученный при культивировании в присутствии метилцеллюлозы, 5 – то же с микрокристаллической целлюлозой

Сопоставление результатов ТСХ бактерицидных веществ, полученных из клеточной массы и супернатанта, также указывает на их отличие. На полосках силикагеля после окраски нингидрином выявлялись пятна с  $R_f$  0,5 для образца из клеточной массы и  $R_f$  0,7 – из супернатанта. В результате биотестирования разрезанных полосок силикагеля (фрагменты по 0,5 см) после ТСХ было установлено, что образцы из клеточной массы оказывались активными против *L. monocytogenes*, а образцы из супернатанта – преимущественно против *E. coli*. Эти данные дают основание предполагать о синтезе *B. circulans* Ск2ч двух пептидных компонентов с несколько различной антимикробной активностью.

В результате сравнительных испытаний по выбору способа выделения бактерициноподобного вещества из бесклеточных супернатантов *B. circulans* установлено, что более предпочтительным оказался метод преципитации целевой фракции с помощью неполярных растворителей (табл. 5). Теоретической предпосылкой целесообразности выбора указанного способа явилось то, что бактериоцины по своей природе имеют аффинность к гидрофобным растворителям, что предполагает возможность их сбора на границе раздела фаз (вода/растворитель). Дихлорметан обладает низкой температурой кипения (40°C), меньшим уровнем токсичности по сравнению с хлоро-

формом, толуолом, легко удаляется из растворов и, благодаря этому, имеется возможность для многократного его использования. Кроме того, обработка супернатанта ДХМ позволяет выделить до 94,6% целевой субстанции с одновременным снижением в ней (на 86% по массе) количества балластных веществ (табл. 6).

Таблица 5

**Выходы образцов бактериоциноподобного вещества в зависимости  
от способа обработки супернатанта**

| Способ и средство выделения     |                      | Выход, АЕ*/100 мл | Потери, АЕ/100 мл |
|---------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Высаливание                     | Сульфат аммония      | 48 000 ± 17 000   | Около 52 000      |
| Сорбция на твердых носителях    | Уголь активированный | 54 000 ± 8 000    | Около 46 000      |
|                                 | Силикагель 100/250   | 72 000 ± 12 000   | Около 28 000      |
|                                 | Оксид алюминия       | 16 000 ± 4 000    | Около 84 000      |
|                                 | Аэросил А-300        | 43 000 ± 9 000    | Около 57 000      |
| Разделение в двухфазной системе | Хлороформ            | 93 000 ± 15 000   | Около 7 000       |
|                                 | Дихлорметан          | 95 000 ± 11 000   | Около 5 000       |
|                                 | Толуол               | 75 000 ± 6 000    | Около 3 600       |

\* АЕ – арбитражная единица активности в отношении *E. coli*.

Таблица 6

**Количественные показатели фракционирования супернатанта  
*B. circulans* Ск2ч с использованием дихлорметана**

| Образцы            | Содержание сухих веществ |       | Активность против <i>E. coli</i> , АЕ |           |       |
|--------------------|--------------------------|-------|---------------------------------------|-----------|-------|
|                    | мг                       | %     | АЕ/мг                                 | Суммарная | % АЕ  |
| Супернатант        | 850                      | 100,0 | 30,0                                  | 3348      | 100,0 |
| Верхняя фаза       | 740                      | 86,2  | 0,2                                   | 148       | 4,4   |
| Промежуточная фаза | 108                      | 12,7  | 29,6                                  | 3200      | 94,6  |
| Нижняя фаза        | 10                       | 1,0   | 1,0                                   | 10        | 1,0   |

Таким образом, способность штамма *B. circulans* Ск2ч производить бактерицидное вещество на простых по составу средах при обычных условиях аэробного роста с возможностью его извлечения малозатратными методами делает этот штамм технологически перспективным в качестве продуцента нового антибактериального средства. В результате выполненных исследований были определены условия для получения и более глубокого изучения его свойств и химической структуры.

Полученные нами данные о влиянии некоторых полисахаридов (декстрин, крахмал) на выход бактерицидного вещества согласуются с первыми работами, проводимыми с бактериями *B. circulans* [20]. Сведений об эффективности целлюлоз в отношении синтеза антимикробных пептидов в доступной литературе не обнаружено. Имеются публикации о способности бацилл этой группы вырабатывать ферменты, расщепляющие сложные полисахариды [21] и даже гербициды [22] вне связи с продукцией антимикробных веществ. В целом же вопрос о питательных потребностях штам-

мов-продуцентов для микробного синтеза бактериоцинов/бактериоцино-подобных веществ, остается по-прежнему неясным. По мнению некоторых исследователей [1, 9, 10], для активной продукции этих веществ есть смысл использовать бедные по азоту среды, так как в этом случае создаются лучшие условия для их наработки, что дает возможность бактериям конкурировать с другими в общей экологической нише. Эта точку зрения подтверждают и наши данные (табл. 1). По всей видимости, такая закономерность может касаться и других веществ подобного рода [23].

Известна связь биосинтеза пептидных антибиотиков типа полимиксина и бутирозина со спорообразованием продуцентов [24]. По этой причине продуценты этих антибиотиков обычно культивируют в течение 3–5 сут. По нашим данным, бактерицидное вещество штамма *B. circulans* Ск2ч накапливается в КЖ еще до появления спор. Результаты белкового электрофореза свидетельствуют о том, что величина молекулярной массы антимикробной субстанции Ск2ч составляет 5–6 кДа (рис. 2), тогда как у антибиотиков из группы полимиксинов – около 1 кДа [8, 9, 25, 26]. В то же время полученное бактерицидное вещество по величине молекулярной массы более соответствует бактериоцинам класса II лактобактерий [27, 28], но отличается от них более широким спектром антимикробного действия.

Выбранный нами способ извлечения бактериоцидного вещества из супернатанта при помощи неполярного растворителя дихлорметана отличается простотой и эффективностью. Интерфазная пленка, собираемая на границе раздела фаз, содержит более 90% целевого продукта (см. табл. 5, 6). Ранее описанный способ выделения бактериоцинов был основан на использовании хлороформа [29], который обладает сильным наркотическим действием.

### Заключение

Таким образом, установлено, что для глубинного культивирования штамма *B. circulans* Ск2ч и накопления бактериоциноподобного вещества могут быть использованы простые среды, включающие минеральные источники азота, дрожжевой экстракт, соли, а в качестве источника углерода – олиго- или полисахариды. При выделении бактериоциноподобного вещества из культуральной жидкости целесообразно использовать метод двухфазного разделения с применением наиболее безопасного дихлорметана. Бактериоциноподобное вещество Ск2ч, обладающее широким спектром антимикробного действия, имеет по данным ДСН ПААГ-электрофореза молекулярную массу около 6 кДа, что отличает его от известных антибиотиков.

### Литература

1. Abriouel H., Franz C.M., Omar N.B., Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins // FEMS Microbiology Reviews. 2011. Vol. 35. P. 201–232.

2. Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y., Kurahashi K. Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis // J. Biochemistry. 1985. Vol. 98. P. 585–603.
3. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* // J. Applied Microbiology. 2008. Vol. 104, № 6. P. 1675–1684.
4. Gharai-Fathabad E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review // American Journal of Drug Discovery and Development. 2011. Vol. 1 (1). P. 58–69.
5. Perez C., Suarez C., Castro G.R. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* clusters // Folia Microbiologica. 1993. Vol. 38 (1). P. 25–28.
6. Pat. 3856939 USA. Antibiotic-49 / Murao S., Meyers E., Parker W. L. // Filed 07/04.72. Issued 24/12.74. United States Patent Office.
7. Pat. 4341768 USA. A novel peptide antibiotic complex designated herein as Bu-2470 is produced by fermentation of *Bacillus circulans* strain G493-B6 / Masataka K., Takeo M., Hiroshi T., Hiroshi K. // Filed 03.04.81; Issued 27.07.82. United States Patent Office.
8. Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages // Letters in Applied Microbiology. 1998. Vol. 27. P. 9–13.
9. He Z., Kisla D., Zhang L. et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin // Applied and Environmental Microbiology. 2007. Vol. 73, № 1. P. 168–178.
10. Svetoch E.A., Stern N.J., Eruslanov B.V. et al. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins // J. Food Protection. 2005. Vol. 68. P. 11–17.
11. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В., Калмантаев Т.А. и др. Культуральные особенности бацилл группы *circulans-subtilis-polymyxa* как продуцентов бактерицидных веществ широкого спектра действия // В мире научных открытий. 2010. № 5 (11). Ч. 1. С. 64–72.
12. Todar K. Online Textbook of Bacteriology. URL: <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> © 2009 Kenneth Todar, PhD.
13. Петерсон А.М., Глинская Е.В., Пермькова Н.Ф. Микробиоценоз яблонной тли // Известия Саратовского университета. Сер. Химия. Биология. Экология. 2008. Т. 8, № 2. С. 79–83.
14. Świącicka I. Protein profile and biochemical properties of *Bacillus circulans* isolated from intestines of small free-living animals // Folia Microbiologica. 2001. Vol. 46. P. 165–171.
15. Kumar M., Philip L. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan // J. Environmental Science and Health. 2006. Vol. 41. P. 81–96.
16. *Bacillus cereus* and *B. circulans* – novel inoculants for crops / Scientific Correspondence Current Science. 2006. Vol. 90, № 5. P. 642.
17. Михайловская Н.А., Касьянчик С.А., Миканова О. Влияние бактериального удобрения калиплант на использование калия зерновыми культурами и горохом на дерново-подзолистой супесчаной почве // Известия Национальной АН Белоруссии. 2009. № 3. С. 42–48.
18. Патент РФ № 2252959. Способ получения бактериального ферментного препарата пектин-лиазы / Иваненко А.А., Сафонов В.С., Змеева Н.Н., Чурбанов В.Г., Саитова Н.А. // Опубликовано: 27.05.2005. Бюл. № 15. 7 с.
19. Shagger H. Tricine dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Folia Microbiologica. 1987. № 166. P. 368–379.
20. Murray F.J., Tetrault P.S., Kaufmann O.W., Koffler H. Circulin, an antibiotic from an organism resembling *Bacillus circulans* // J. Bacteriology. 1949. Vol. 57. P. 305–312.
21. Watanabe T., Oyanagy W., Suzuki K., Tanaka H. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation // J. Bacteriology. 1990. Vol. 172. P. 4017–4022.

22. Megadi V.B., Tallur P.N., Hoskeri R.S. et al. Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus circulans* // Indian J. Biotechnology. 2010. Vol. 9. P. 173–177.
23. Czaczayk K., Bialaz W., Myszka K. Cell surface hydrophobicity of *Bacillus* spp. as a function of nutrient supply and lypopeptides biosynthesis and its role in adhesion // Polish J. Microbiology. 2008. Vol. 57, № 4. P. 313–319.
24. Nam D.H., Ryu D.D. Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1985. Vol. 27, № 5. P. 798–801.
25. Kurusu K., Ohba K., Arai T., Fukushima K. New peptide antibiotics LI-FO3, FO4, FO5, FO7, and FO8, produced by *Bacillus polymyxa* I. Isolation and characterization // J. Antibiotics. 1987. Vol. 40. P. 1506–1514.
26. Raza W., Yang W., Shen Q.-R. Paenibacillus polymyxa: Antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment // J. Plant Pathology. 2008. Vol. 90, № 3. P. 419–430.
27. Klaenhammer T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Reviews. 1993. Vol. 12. P. 39–86.
28. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения // Электронный научный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ». URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>. С. 164–198.
29. Burianek L.L., Yousef A.E. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures // Letters in Applied Microbiology. 2000. Vol. 31. P. 193–197.

Поступила в редакцию 03.03.2012 г.

*Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 2 (18). P. 52–65*

**Timur A. Kalmantaev, Gulnur T. Sadikova,  
Vladimir V. Perelygin, Viktor D. Pokhilenko**

*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,  
Obolensk, Moscow region, Russia*

### **BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCE *Bacillus circulans* AND WAY OF ITS PRODUCTION**

*The development of antibiotic resistance is a key problem for a health care service. An approach to solve it relies on limited and reasonable application of antibiotics as well as on utilization of some other substances with more efficient mechanisms of antimicrobial action. Low-molecular-weight peptides called bacteriocins kill cells by making pores in cell walls irrespective of their antibiotic resistance. In this context, of particular interest are some representatives of the genus of Bacillus, especially of species circulans-polymyxa, producing bacteriocins and wide-spectrum activity bacteriocin-like substances. However, production of the substances in sufficient amounts for practical application is still doubtful.*

*Objectives of the research were to study factors that might influence production of the bacteriocin-like substance Ck2th by newly isolated strain B. circulans, and to select an appropriate procedure for isolation of the substance from fermentats to assess then its properties.*

*The strain was proliferated and subcultured on nutrient agar at 30°C for two days. An appropriate composition of nutrient broth for submerged cultivation of the strain was selected using 750 ml flasks containing 100 ml of nutrient media. Bactericidal*

activity of the substance was determined by placing samples of desired volumes in Petri dishes containing freshly seeded lawns of test strains of Gram-positive and Gram-negative microorganisms. The activity was expressed in arbitrary units (AU) measured for 1ml or 1mg of the sample depending on the level of dilution. Such methods as salt precipitation (ammonium sulfate), solid carrier sorption (silica gel, carbon, aluminum oxide, aerosil) and organic solvent two-phase separation (dichloromethane, chloroform, toluene) were tested for isolation of active substances from fermentats. Molecular identification of the bacteriocin-like substance was performed by SDS PAGE followed by 5% glutaraldehyde fixation and coomassie staining. Before biological testing the gel was washed, placed in a Petri dish and overlaid with melted agar containing test cells. After incubation zones of inhibition of the growth of the test strain were fixed against markers.

The dependence between the yield of *B. circulans* Ck2th and a type of nitrogen and carbon source in the medium and time of submerged cultivation was determined. The method of two-phase separation in the presence of dichloromethane was found to be the most effective one to isolate the product from the culture fluid. A 5–6kDa peptide was shown to be responsible for antimicrobial action of the bacteriocin-like substance, making it quite different from all known antibiotics.

**Key words:** microorganisms; bacteriocins and bacteriocin-like substances; antimicrobial activity.

Received March 3, 2012