

Любимова Л.В.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
КОМПОЗИЦИЙ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS***

Любимова Любовь Викторовна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры технологии пищевых продуктов и организации питания ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», Майкоп, Россия
E-mail: liubava.liubimova@mail.ru
Тел.: 8(988) 475 64 04

Обеспечение населения качественными и безопасными продуктами питания является приоритетной задачей, поставленной перед пищевой промышленностью Российской Федерации. Одним из методов решения данной задачи является создание альтернативных, безвредных антибактериальных композиций на основе природных компонентов.

*Цель работы – исследование антибиотического действия природного бактериостата хитозана и его производных в отношении бактерий рода *Proteus*.*

*Объекты исследования – высокомолекулярный хитозан, низкомолекулярный хитозан, сукцинат хитозана, чистая культура *Proteus vulgaris* 222.*

*В статье приводятся результаты исследования использования в качестве антибактериального агента растворов высокомолекулярного, низкомолекулярного хитозана и сукцината хитозана в концентрации 1%, в отношении чистого лабораторного штамма *Proteus vulgaris* в различной его концентрации в 1 см³.*

*Установлена предельная начальная концентрация клеток *Proteus vulgaris* в продукте, подавляемая 1 %-ными растворами хитозана. Показан рост ингибирующего действия исследуемых антибиотических веществ с увеличением экспозиции.*

Ключевые слова: *безопасность продуктов питания, микробная обсемененность, хитозан, бактерии рода *Proteus*, природный бактериостат.*



Для цитирования: Любимова Л.В. Исследование активности антибактериальных композиций в отношении бактерий рода *PROTEUS* // Новые технологии. 2020. Вып. 3(53). С. 47-54. DOI: 10.24411/2072-0920-2020-10305.

Lyubimova L.V.

**INVESTIGATION OF THE ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL
COMPOSITIONS AGAINST *PROTEUS* BACTERIA**

Lyubimova Lyubov Victorovna, Ph.D., a senior researcher of the Department of Food Technology and Catering
FSBEI of HE «Maykop State Technological University», Maykop, Russia
E-mail: liubava.liubimova@mail.ru
Tel.: 8(988) 475 64 04

Providing the population with high-quality and safe food products is a priority task for the Russian Federation food industry. One of the methods for solving the problem is creation of alternative, harmless antibacterial compositions using natural components.

The aim of the research is to study the antibiotic action of the natural chitosan bacteriostat and its derivatives against Proteus bacteria. The objects of the research are high molecular weight chitosan, low molecular weight chitosan, chitosan succinate, Proteus vulgaris 222 pure culture.

The article presents the results of the research of using the solutions of high molecular weight, low molecular weight chitosan and chitosan succinate at a concentration of 1% as an antibacterial agent in relation to a pure laboratory strain of Proteus vulgaris in various concentrations of 1 cm³.

The maximum initial concentration of Proteus vulgaris cells in the product has been established, which is suppressed by 1% chitosan solutions. The growth of the inhibitory effect of the studied antibiotic substances with an increase in exposure has been shown.

Key words: food safety, microbial contamination, chitosan, Proteus bacteria, natural bacteriostat.

For citation: Lyubimova L.V. Investigation of the activity of antibacterial compositions against Proteus bacteria // Novye Tehnologii (Majkop). 2020. Issue 3(53). P. 47-54. DOI: 10.24411 / 2072-0920-2020-10305.

Согласно Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации, обеспечение населения страны безопасной, качественной и доступной пищевой продукцией является стратегической целью продовольственной безопасности [12]. К важнейшим аспектам качества пищевой продукции относится микробиологическая безопасность на всех этапах ее выработки и реализации. Нарушение технологических параметров производства, несоблюдение требований к условиям хранения пищевых продуктов приводит к угрозам возникновения острых кишечных и токсикоинфекций.

Значительную роль в возникновении пищевых заболеваний людей играют условно-патогенные бактерии группы кишечной палочки, а также протей [9]. Присутствие *Proteus* в продуктах питания является регламентируемым параметром ТР ТС 021/2011 [11].

Бактерии рода *Proteus* – прямые, подвижные грамотрицательные палочки 0,4-0,8×1-3 мкм, обладающие способностью к роению, образуя на поверхности плотной питательной среды вуалеобразный голубоватый налет с характерным гнилостным запахом [9].

Отличительной особенностью бактерий рода *Proteus* является их полиантибиотикорезистентность, а также невосприимчивость к большинству известных антимикробных препаратов и консервантов, связанные с более высокими адаптационными возможностями в сравнении с возбудителями классических пищевых инфекций [1].

В связи с этим, поиск и разработка новых эффективных антибактериальных композиций и препаратов является перспективным направлением развития пищевой биотехнологии.

В настоящее время отмечается растущий интерес к антибиотическим агентам природного происхождения с выраженными антимикробными и бактериостатическими свойствами, к группе которых относятся бактериоцины – антимикробные вещества широкого спектра действия [5].

К таким бактериоцинам относится хитозан – полисахарид животного происхождения, частично деацетилированное производное хитина, добываемого из панциря членистоногих.

Механизм антибактериального действия хитозана обусловлен его множественным неспецифическим влиянием на структурные компоненты бактериальной и грибной клетки.

В отличие от классических консервантов, хитозан способен оказывать воздействие одновременно в нескольких направлениях, разрушая различные клеточные структуры – белков, липополисахаридов, цитоплазматической мембраны, мембранных тейхоевых кислот. Этим характеризуется его высокая эффективность в отношении грамположительных, грамотрицательных микроорганизмов, плесневых грибов и дрожжей. В значительной степени на видоспецифическую избирательность влияет молекулярная масса образцов хитозана [6].

В связи с этим были проведены исследования с целью разработки антибактериальной композиции на основе природного бактериостата хитозана и его производных в отношении условно-патогенных бактерий рода *Proteus*.

Цель – исследование антибактериальной активности хитозана и его производных на условно-патогенные бактерии рода *Proteus*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- исследование влияния вида и молекулярной массы бактериостата на выживаемость бактерий рода *Proteus*;
- исследование влияния исходной концентрации бактериальных клеток в суспензии на выживаемость бактерий рода *Proteus* при взаимодействии с раствором бактериостата;
- исследование влияния продолжительности экспозиции на выживаемость бактерий рода *Proteus*.

В качестве объектов исследования выбраны: высокомолекулярный хитозан ММ 200 кДа (ВМХ), низкомолекулярный хитозан ММ 30 кДа (НМХ), сукцинат хитозана (СХ) (ООО «Биопрогресс», г. Щелково). В качестве растворителей использованы раствор уксусной кислоты 1 %-ный, дистиллированная вода.

При проведении исследования использовали стандартные методики. Приготовление суспензий с заданной концентрацией клеток условно-патогенных микроорганизмов проводили с применением оптического стандарта мутности МакФарландана (МУК 4.2.1890-04) [10]. Культивирование чистого штамма *Proteus vulgaris* 222, пробоподготовку, посев и количественный анализ проводили по ГОСТ 28560-90 [3].

Отличительной особенностью использования в пищевой промышленности хитозана является наличие «вяжущего» вкуса его кислотных растворов, усиливающегося с увеличением концентрации вещества в растворе [8]. В качестве оптимальной концентрации, не ухудшающей органолептические показатели, использовали 1% для всех исследуемых образцов.

Известно, что с увеличением молекулярной массы резко снижается способность к растворению в воде образцов хитозана. Растворители были подобраны в соответствии с молекулярной массой исследуемых образцов, а также с востребованностью в технологии общественного питания (уксусная кислота). Концентрация уксусной кислоты подобрана с учетом минимально допустимого количества анионов в растворе, способных к реакции с молекулой хитозана, не вызывающей его осаждение – 1 % [7].

Одним из факторов, оказывающих ингибирующее влияние на микроорганизмы является рН среды воздействующего антимикробного агента (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика образцов хитозана

Наименование показателей	Значение показателя		
	ВМХ	НМХ	СХ
рН 1 %-го раствора хитозана в 1 %-ной уксусной кислоте	3,97	-	-
рН 1 %-го водного раствора хитозана	-	5,04	7,06
Содержание полисахарида, %	89,4	89,4	89,4

Чистые лабораторные штаммы *Proteus vulgaris* культивировали на плотной питательной среде МПА в условиях термостата при $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ч [2]. Затем из полученных колоний готовили исходные суспензии клеток с концентрацией $0,93 \cdot 10^9/\text{см}^3$, используя стандарт мутности МакФарландана 10 единиц.

Из исходной суспензии готовили ряд разведений в физиологическом растворе культуры *Proteus vulgaris* в концентрации от 10^1 до 10^9 микробных клеток/ см^3 , исследование проводили в трех повторностях.

На следующем этапе, к 1 см^3 полученных разведений добавляли 1 %-ные растворы образцов хитозана в объеме 1 см^3 . Полученные суспензии центрифугировали и проводили посев на плотную питательную среду висмут-сульфит агара (ВСА) в двукратной повторности. Продолжительность культивирования 24-48 ч при температуре окружающей среды ($35\pm 2^\circ\text{C}$). На поверхности плотной среды ВСА *Proteus vulgaris* образовали колонии с ровными краями зеленовато-коричневого оттенка [4, 9]. Результаты микробиологических исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выживаемость клеток *Proteus vulgaris* в зависимости от их концентрации в растворе

Действующие антимикробные вещества	Концентрация клеток <i>Proteus vulgaris</i> в 1 см^3								
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
	Количество выживших клеток в 1 см^3 после экспозиции 24 ч								
Контроль (раствор уксусной кислоты 1 %-ный)	20000	1000	100	0	0	0	0	0	0
Раствор ВМХ	14000	600	35	0	0	0	0	0	0
Раствор НМХ	30000	3000	700	500	300	260	60	0	0
Раствор СХ	10МЕ*	10 МЕ*	97000	10000	5200	1200	260	40	5

*10МЕ – $0,93 \cdot 10^9$ – клеток/ см^3 для бактерий кишечной группы.

Анализ данных таблицы 2 показывает, что угнетение микробной флоры достигается по достижению концентрации 10^7 клеток/ см^3 . При этом наилучший результат показал образец ВМХ. При увеличении концентрации клеток в суспензии наблюдается сохранение значительного количества жизнеспособных единиц, что свидетельствует о недостаточности концентрации действующего вещества для сильно контаминированных продуктов. Однако продукты с подобной степенью микробного загрязнения недопустимы к использованию в технологии продукции общественного питания и подлежат утилизации.

С уменьшением концентрации клеток наблюдается полная стерилизация суспензий, при этом отмечено синергетическое антибактериальное действие ВМХ и раствора уксусной кислоты. Сила антибактериального действия возрастает в ряду СХ – НМХ – ВМХ, что

свидетельствует так же о видоспецифичности действия хитозана и его производных в отношении *Proteus vulgaris*.

Для установления скорости антибактериального действия растворов хитозана провели посев по истечении 4 и 24 часов экспозиции суспензий с максимально допустимой концентрацией диапазона антибиотического действия 1 %-ных растворов исследуемых образцов бактериостата – 10^7 клеток/см³. Влияние времени экспозиции на выживаемость клеток *Proteus vulgaris* представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние времени экспозиции на выживаемость клеток *Proteus vulgaris*

Образец суспензии, обработанный антимикробным раствором	Стерилизация суспензии, %, при времени, ч и концентрации <i>Proteus vulgaris</i>			
	4 часа		24 часа	
	10^7	10^6	10^7	10^6
<i>Proteus vulgaris</i> + Контроль (раствор уксусной кислоты 1 %-ный)	80,2 %	98,0 %	100,0 %	100,0 %
<i>Proteus vulgaris</i> + ВМХ	91,8 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
<i>Proteus vulgaris</i> + НМХ	73,4 %	92,0 %	99,5 %	100,0 %
<i>Proteus vulgaris</i> + СХ	65,1 %	75,0 %	99,03 %	99,0 %

Как показывают данные таблицы 3, увеличение срока экспозиции приводит полному угнетению бактериальной флоры в образцах ВМХ и НМХ, при этом отмечается наибольшая скорость реакции для образца ВМХ, и наименьшая для СХ. Плавное уменьшение количества жизнеспособных бактериальных клеток в суспензии свидетельствует как о наличии антибактериального, так и бактериостатического действий, не снижающихся в ходе экспозиции.

Выводы

1. Доказана антибактериальная активность высокомолекулярного хитозана в отношении бактерий рода *Proteus*, что позволяет рекомендовать его как природный консервант в технологии продукции общественного питания.

2. Установлено, что с ростом начальной концентрации контаминанта в продукте наблюдается снижение антибактериальной активности образцов хитозана, что свидетельствует о недостаточности концентрации активного вещества в растворе.

3. Установлено, что антибиотическое и бактериостатическое действие хитозана и его производных не снижается в ходе экспозиции суспензий и остается постоянным.

Литература:

1. Анганова Е.В. Антибиотикорезистентность условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями // Сибирский медицинский журнал. 2012. №7. С. 98-99.

2. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* // Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017. №2(38). С. 70-75.

3. ГОСТ 28560-90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.

4. Пискаева А.И., Дышлюк Л.С., Сидорин Ю.Ю. Влияние кластерного серебра на патогенную микрофлору органических отходов агропромышленного комплекса // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 41, №2. С. 132-140.

5. Козлов А.В. Разработка антимикробной композиции на основе низина и хитозана для применения в технологии натуральных мясных полуфабрикатов, копченостей и ветчины: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04 / Моск. гос. ун-т приклад. биотехнологии. М., 2010. 27 с.

6. Куликов С.Н., Тюрин Ю.Н., Хайруллин Р.З. Антибактериальная активность хитозана в отношении энтеробактерий и стафилококков, выделенных у пациентов с дисбактериозом кишечника // Казанский медицинский журнал. 2010. №5. С. 657-660.

7. Эффективность применения хитозана и электромагнитного поля крайне низкой частоты для повышения микробиологической безопасности холодных блюд / Любимова Л.В. [и др.] // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2017. №5/6 (359/360). С. 87-91.

8. Любимова (Моторина) Л.В., Бугаец Н.А., Ильчишина Н.В. Увеличение сроков реализации кулинарных блюд и изделий с использованием бактериостатов природного происхождения // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2016. №1(349). С. 31-33.

9. Мауль О.Г., Чугунова Е.О., Татарникова Н.А. Проблема выделения сальмонелл из продуктов, обсемененных бактериями рода *Proteus* // Пермский аграрный вестник. 2016. №1(13). С. 60-64.

10. МУК 4.2.1890-04 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

11. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза.

12. Об утверждении Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации: Указ Президента РФ от 21.01.2020, №20.

Literature:

1. Anganova E.V. Antibiotic resistance of opportunistic enterobacteria isolated from patients with acute intestinal infections // Siberian Medical Journal. 2012. No. 7. P. 98-99.

2. Vasiliev D.A., Feoktistova N.A., Zolotukhin S.N. Isolation and study of the biological properties of *Proteus* bacteria // Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy. 2017. No. 2(38). P. 70-75.

3. GOST 28560-90 Food Products. Method for detecting bacteria of the *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* genera.

4. Piskaeva A.I., Dyshlyuk L.S., Sidorin Yu.Yu. The effect of cluster silver on the pathogenic microflora of organic waste from the agro-industrial complex // Technique and Technology of Food Production. 2016. Vol. 41, No. 2. P. 132-140.

5. Kozlov A.V. Development of an antimicrobial composition based on nisin and chitosan for use in the technology of natural meat semi-finished products, smoked meats and ham: abstr. of dis. ... Cand. of Tech. Sciences: 05.18.04 / Moskow state university of biotechnology. M., 2010. 27 p.

6. Kulikov S.N., Tyurin Yu.N., Khayrullin R.Z. Antibacterial activity of chitosan against enterobacteria and staphylococci isolated in patients with intestinal dysbiosis // Kazan Medical Journal. 2010. No. 5. P. 657-660.

7. The effectiveness of the use of chitosan and an electromagnetic field of extremely low frequency to increase the microbiological safety of cold dishes / Lyubimova LV [et al.] // Proceedings of higher educational institutions. Food technology. 2017. No. 5/6 (359/360). P. 87-91.

8. Lyubimova (Motorina) L.V., Bugaets N.A., Ilchishina N.V. The increase in the timing of the implementation of culinary dishes and products using bacteriostats of natural origin // News of higher educational institutions. Food technology. 2016. No. 1(349). P. 31-33.

9. Maul O.G., Chugunova E.O., Tatarnikova N.A. The problem of the isolation of salmonella from products seeded with *Proteus* bacteria // Perm Agrarian Bulletin. 2016. No. 1(13). P. 60-64.

10. MUC 4.2.1890-04 Methods of control. Biological and microbiological factors. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs.

11. On the safety of food products: TR CU 021/2011 Technical regulations of the Customs Union.

12. On the approval of the Doctrine of Food Security of the Russian Federation: Decree of the President of the Russian Federation of 21.01.202. No. 20.