

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ

З.А. Канарская, А.В. Канарский,
В.К.Чеботарь, А. В. Щербаков

Ключевые слова: щелока, питательная среда, бактерии, биоконверсия, бактериальные полисахариды, энтеросорбенты

Показано, что щелока производства полуцеллюлозы из древесины березы могут быть основой питательной среды для культивирования чистых монокультур бактерий. Изучение взаимодействия Т-2 микотоксина с инактивированными бактериями позволило рекомендовать штаммы бактерий *Xanthomonas sp2* и *Rhizobium leguminosarum 1082* для производства энтеросорбентов.

Актуальность работы

Полисахариды микробиологического происхождения находят применение в медицине, фармацевтической, пищевой и нефтедобывающей промышленности. Растворы декстранов используются как заменители плазмы крови в медицине при больших потерях крови. Предложено использование альгинатов в качестве компонентов в системах адресной доставки лекарств. Бактериальные экзополисахариды представляют группу перспективных стимуляторов защитных сил организма. Так экзополисахариды бактерий *Paenibacillus polymyxa*, обладают антивирусными и противоопухолевыми свойствами, оказывают профилактическое действие при экспериментальной стафилококковой инфекции и пролонгируют действие лекарственных веществ, повышая неспецифическую реактивность организма [1, 2, 3].

Полисахариды являются важнейшими компонентами клеток микроорганизмов. Многие физиологические, биохимические и иммунохимические особенности полисахаридов определяются их распределением в клетке: наружная и цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, выделение в виде внеклеточных слизей в окружающую среду (экзополисахариды) [4].

Экзополисахариды выполняют ряд важных биологических функций: защитную, резервную и др. В настоящее время экзополисахариды широко применяются во многих отраслях промышленности благодаря своим уникальным свойствам - загущения, студнеобразования, эмульгирования, влагоудержания и стабилизации. Индустриальные потребности в биополимерах данного класса возрастают [5]

Полисахариды, полученные из микроорганизмов, обладают рядом преимуществ (климатическая независимость, простота и экономичность производства, регулирование свойств) и занимают все более лидирующие позиции. Поэтому производству полисахаридов микробного происхождения, а среди них и бактериальным полисахаридам, уделяют большое внимание.

Сфера применения полисахаридов микробиологического происхождения определяется с учетом их свойств, как функциональных - способность растворяться в воде, создавать высоковязкие растворы, студни, гели, так и биологических. В настоящее время находят применение такие бактериальные полисахариды как ксантан, геллан, курдлан и другие [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Для решения проблем, связанных с содержанием микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных [6], в качестве адсорбентов микотоксинов рекомендуется использовать клеточные стенки дрожжей для адсорбции микотоксинов [14, 15].

Во всех исследованиях уделяется внимание изучению взаимодействия полисахаридов внутриклеточных и полисахаридов, содержащихся в клеточной стенке микроорганизмов, с патогенами и токсинами различной природы. Следует заметить, что

в основе процесса выведения патогенов и токсинов из организма животных лежит адсорбция этих веществ с поверхностью полисахаридов. Доступная для адсорбции поверхность полисахаридов, присутствующих в микроорганизмах незначительна. Полисахариды в клетке находятся во взаимосвязи с белками, липидами и другими веществами, мешающими адсорбции, снижающими адсорбционную емкость и доступность поверхности для адсорбции. Также следует отметить, что и доля полисахаридов в общей массе микроорганизмов незначительна.

Микробиологические полисахариды, в отличие от большинства химически синтезированных полимеров, являются биodeградируемыми и не наносят вреда окружающей среде. Возросший интерес к экологически чистым технологиям стимулирует спрос на экзополисахариды микробиологического происхождения. Однако, затраты на производство микробиологических полисахаридов достаточно велики и определяются прежде всего затратами на питательные среды. В этой связи поиск дешевых сырьевых источников для питательных сред весьма актуально.

При химической переработке растительного сырья образуется значительное количество щелоков, в которых содержится целлюлоза и гемицеллюлоза. Использование этого источника углерода для культивирования бактерий предоставляет возможность снизить затраты на производства микробиологических полисахаридов и расширить области их применения [16].

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является биоконверсия вторичных ресурсов производства волокнистых полуфабрикатов из древесины эндофитными, ризосферными и клубеньковыми бактериями с последующим получением на их основе эндосорбентов микотоксинов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- определение состава щелоков, образующихся при получении полуцеллюлозы из древесины березы;
- определение влияния условий культивирования на рост бактерий на питательной среде, полученной из щелоков;
- определение адсорбционных свойств энтеросорбента на основе бактерий по отношению к Т-2 микотоксину.

Методическая часть

В экспериментах использовались штаммы эндофитных (*Bacillus subtilis* TR6.), ризосферных (*Azotobacter chroococum* 12, *Xanthomonas sp.*2, *Agrobacterium radiobacter* 437, *Bacillus subtilis* Ч-13, *Bacillus subtilis* НС8, *Bacillus subtilis* МЗ3, *Bacillus subtilis* ОР3) и клубеньковых (*Rhizobium leguminosarum* 1082) бактерий. Штаммы бактерий предоставлены Всероссийской коллекцией штаммов непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (<http://www.arriam.spb.ru>) и рабочей коллекцией лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. Выбор штаммов обусловлен предположением, что они способны синтезировать внеклеточные полисахариды при культивировании на питательных средах, приготовленных на щелоках производства полуцеллюлозы в которых содержатся углеводы растворенном и твердом виде. Идентификация выделенных штаммов бактерий проведена на основании ПЦР - амплификации и секвенирования гена 16S РНК с использованием стандартных методов молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля, клонирование ПЦР - фрагментов в составе Т - векторов, определение и анализ нуклеотидных последовательностей). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием международной базы данных по нуклеотидным последовательностям рибосомальных генов микроорганизмов RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) и GenBank – один из крупнейших международных депозитариев нуклеотидных последовательностей (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Биомасса бактерий для инокуляции выращивалась на чашках Петри на триптон - соевом агаре - ТСА (г/л): триптон - соевый бульон - 30,0, агар (OXOID Ltd., Англия) - 18,0, вода дистиллированной доводили до 1000 мл.

В качестве контрольной жидкой питательной среды использовался триптон-соевый бульон - ТСБ (Vacto™, Difco Laboratories, США) (г/л): пептон -17,0, триптон - 3,0, NaCl - 5,0, K₂PO₄ -2,5, D – глюкоза - 2,5, вода дист.-1000 мл, pH 7,3 ± 0,2, Культивирование штаммов эндофитных, ризосферных и клубеньковых бактерий проводилось в жидкой среде ТСБ, разведенный в два раза дистиллированной водой, в колбах 500 мл объемом на качалках (200 об/мин.) при температуре 28 °С. После 48 ч. роста методом последовательных серийных разведений определялся титр полученных культур.

В таблице 1 представлен состав щелоков производства полуцеллюлозы из березы и методы их определения. Щелока имеют pH близкую к нейтральной среде и благоприятную для роста используемых в экспериментах штаммов бактерий. Значения показателей ХПК и БПК₅ указывают на высокое содержание органических веществ, пригодных для ассимилирования бактериями. В щелоках присутствуют макро-, микро- и ультра микроэлементы необходимые для роста бактерий.

На основе щелоков были приготовлены питательные среды с содержанием РВ 1,2 %. Определение РВ в питательной среде проводилось методом Бертрана в модификации Шарля.

Таблица 1 - Характеристика щелоков производства полуцеллюлозы из березы для приготовления питательной среды

Наименование показателя	Ед. изм.	Значение	Метод определения	
pH	ед. pH	6,65± 0,20	потенциометрический	
цветность	град. цветности	менее 500	фотометрический	
мутность	ЕМФ	более 100		
сухой остаток	г/дм ³	14020±701	гравиметрический	
осажденный лигнин	г/дм ³	14,6		
ХПК	мгО ₂ /дм ³	11700+1755	флуориметрический	
БПК ₅		5920	ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97	
фенолы	мг/дм ³	3,13±0,97	флуориметрический	
железо (общ)		1,08±0,12	атомно-абсорбционный	
марганец		3,74±0,56		
алюминий		0,521±0,068		
цинк		1,05±0,18		
натрий-ион	мг/дм ³	2551±255	высокоэффективная жидкостная хроматография	
калий-ион		44,7±3,6		
магний-ион		11,0±0,9		
кальций-ион		56,3±5,6		
литий-ион		менее 0,015		
аммоний-ион		1,55±0,31		
хлорид-ион		менее 0,1		
сульфат-ион		менее 0,1		
нитрит-ион		менее 0,05		
нитрат-ион		менее 0,08		
фосфат-ион		менее 0,1		
карбонат-ион		менее 6		потенциометрический

гидрокарбонат-ион		3672 ± 294	
-------------------	--	------------	--

Дополнительные биогенные вещества в питательную среду не вводили. Условия культивирования бактерий на питательной среде, приготовленной на основе щелоков производства полуцеллюлозы из березы аналогичны условиям культивирования бактерий на триптон-соевом бульоне.

Бактериальную массу выделяли из культуральной жидкости, промывали и инактивировали в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

Адсорбционные свойства инактивированных бактерий по отношению к Т-2 микотоксину определяли по методики [17]. Проводили сравнительную оценку адсорбции Т-2 токсина инактивированными дрожжами *Candida scottii* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов представленных в таблице 2 показывает, что на питательной среде, приготовленной на основе щелоков производства полуцеллюлозы из древесины березы, наиболее эффективно культивируются ризосферные бактерии. Эффективность культивирования ризосферных бактерий *Azotobacter chroococum*12, *Xanthomonas sp.*2, *Agrobacterium radiobacter* 437, *Bacillus subtilis* HC8, *Bacillus subtilis* Ч – 13, согласно титру этих бактерий в культуральной жидкости сопоставим с титром этих бактерий в контроле.

Таблица 2 - Титр бактерий при культивировании на питательной среде, приготовленной на щелоках *

Наименование микроорганизма	КОЕ/см ³
<i>Xanthomonas sp</i> 2	1,10*10 ⁹
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 437	1,15*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	1,86*10 ⁹
<i>Azotobacter chroococum</i> 12	1,37*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> TR6	1,12*10 ⁹
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 1082	1,18*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> HC8	1,16*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> MZ3	0,45*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> OP3	0,30*10 ⁹

* Титр бактерий в контроле – 5,5 * 10⁹ КОЕ/см³

Эффективность роста штаммов эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* TR6 и клубеньковых *Rhizobium leguminosarum* 1082 бактерий находится на уровне эффективности роста рассмотренных выше ризосферных бактерий.

Культивирование в рассматриваемых условиях ризосферных бактерий штаммов *Bacillus subtilis* MZ3, *Bacillus subtilis* OP3 позволяет получить титр на порядок ниже.

Изучение адсорбционных свойств инактивированных бактерий показало, что наиболее эффективно Т-2 микотоксин адсорбируют инактивированные ризосферные бактерии *Xanthomonas sp.*2. Истинная адсорбция Т-2 микотоксина этими инактивированными бактериями, а также инактивированными бактериями *Azotobacter chroococum*12, *Bacillus subtilis* TR6, *Rhizobium leguminosarum* 1082, Несколько ниже адсорбция Т-2 микотоксина инактивированными бактериями *Bacillus subtilis* Ч-13, затем бактериями *Bacillus subtilis* MZ3 и *Bacillus subtilis* OP3. При этом истинная адсорбция инактивированными бактериями значительно выше истинной адсорбции Т-2 микотоксина инактивированными дрожжами.

Высокая адсорбционная способность инактивированных бактерий Т-2 микотоксина по сравнению с инактивированными дрожжами вызвана несколькими факторами.

Адсорбционные явления проходят на границе раздела фаз и, прежде всего, взаимосвязаны с удельной поверхности адсорбента, которая возрастает с увеличением дисперсности адсорбента. Известно, что размеры клеток бактерий значительно меньше размеров клеток дрожжей и, соответственно, удельная поверхность бактерий, т.е. поверхность адсорбции, выше у бактерий, чем у дрожжей.

Другим важным фактором, обуславливающим высокую адсорбцию Т-2 микотоксина бактериями, является внеклеточные полисахариды, синтезируемые бактериями. Этим можно объяснить высокую адсорбционную способность инактивированных бактерий *Xanthomonas sp2*, которые используются как продуценты внеклеточных полисахаридов в промышленности. Исходя из адсорбционной способности инактивированных бактерий *Azotobacter chroococum 12*, *Bacillus subtilis TR6*, *Rhizobium leguminosarum 1082* можно сделать вывод и об эффективном синтезе внеклеточных полисахаридов этими бактериями при их культивировании на питательных средах, приготовленных на щелоках химической переработки древесины березы. Заметим, что дрожжи *Candida scottii* штамм К-41 и *S. cerevisiae* ВКПМ У-720 внеклеточные полисахариды не синтезируют.

Таблица 3 - Эффективность адсорбции Т- 2 микотоксина инактивированными бактериями и дрожжами

Наименование адсорбента	рН 2	рН 8	Истинная адсорбция, %
	Адсорбции, %	Десорбции, %	
<i>Xanthomonas sp2</i>	92,0	1,2	90,9
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 437	84,0	3,4	81,1
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	90,6	8,3	83,1
<i>Azotobacter chroococum</i> 12	90,6	4,2	86,9
<i>Bacillus subtilis</i> TR6	92,0	5,3	87,1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 1082	89,3	1,2	88,2
<i>Bacillus subtilis</i> HC8	84,0	2,1	82,2
<i>Bacillus subtilis</i> MZ3	74,6	1,5	73,5
<i>Bacillus subtilis</i> OP3	80,0	4,7	76,2
<i>Candida scottii</i> штамм К-41	35,0	9,0	26,0
<i>S. cerevisiae</i> ВКПМ У-720	35,0	2,3	32,7

Адсорбция микотоксинов адсорбентами происходит за счет образования физических и химических связей между функциональными группами адсорбента, которые расположены на его поверхности, и микотоксина. Хемосорбция предпочтительней физических связей, так как обеспечивает прочное удержание микотоксинов на поверхности адсорбента. Следовательно, только за счет хемосорбции возможно эффективное выведение из организма микотоксинов. Оценить вклад хемосорбции в адсорбцию Т-2 микотоксина можно при проведении десорбции микотоксина в условиях, соответствующих физиологическим условиям желудочно-кишечного тракта животного.

Результаты исследований, представленных в табл. 3, показывают, что адсорбция Т-2 микотоксина инактивированными бактериями и дрожжами происходит за счет хемосорбции, так как десорбция микотоксина при рН 8 незначительна по сравнению с адсорбцией при рН 2. При этом десорбция Т-2 микотоксина с поверхности инактивированных бактерий *Xanthomonas sp2* и *Rhizobium leguminosarum 1082* наименьшая по сравнению с другими инактивированными бактериями и дрожжами. В результате истинная адсорбция Т-2 микотоксина этими инактивированными

бактериями выше по сравнению с другими инактивированными бактериями и дрожжами.

Выводы

1. Установлено, что питательная среда, приготовленная на щелоках производства полуцеллюлозы из березы, пригодна для культивирования эндофитных, ризосферных и клубеньковых бактерий.

2. Инактивированная биомасса эндофитных, ризосферных и клубеньковых бактерий эффективней адсорбирует Т-2 микотоксин по сравнению с инактивированными дрожжами.

3. Инактивированные ризосферные бактерии *Xanthomonas sp2* и клубеньковые бактерии *Rhizobium leguminosarum 1082* наиболее эффективно адсорбируют Т-2 микотоксин и могут быть рекомендованы для получения промышленных энтеросорбентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar A.S., Mody K., Jha B. // Bacterial exopolysaccharides—a perception. J Basic Microb . 2007. № 47. P. 103–117/
2. Ramberg J.E., Nelson E.D., Sinnott R.A. // Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. Nutr J .2010. № 9, P.1–60.
3. Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. // Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym . 2012. № 87. P. 951–962.
4. West, T.P. Improved polysaccharide production using strain improvement // Microbial processes and products. - N.J.: Humana Press Inc. 2005. P. 301-311.
5. Freitas F., Alves V.D., Reis M.A.M. / Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol. 2011. № 29. P. 388–398.
6. Purama R.K., Goswami P., Khan A.T., Goya I.A. // Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. Carbohydr Polym. 2009. № 76. P. 30–35.
7. Hay I.D., Gatland K., Campisano A., Jordens J.Z., Rehm B.H.A. // Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain. Appl Environ Microb. 2009. № 75. P. 6022–6025.
8. Gaona G., Nunez C., Goldberg J.B., Linford A.S., Najera R., Castaneda M., Guzman J., Espin G., Soberon-Chavez G. // Characterization of the *Azotobacter vinelandii* alg C gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. FEMS Microbiol Lett. 2004. № 238. P. 199–206.
9. Sarwat F., Ul Qader S.A., Aman A., Ahmed N. // Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Int J Biol Sci. 2008. № 4. P. 379–386.
10. Bajaj I.B., Survase S.A., Saudagar P.S., Singhal R.S. // Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. Food Technol Biotech. 2007. № 45. P. 341–354.
11. Palaniraj A., Jayaraman V. // Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. J Food Eng. 2011. № 106. P.1–12.
12. Singh R.S., Saini G.K., Kennedy J.F. // Pullulan: microbial sources, production and applications. Carbohydr Polym. 2008. № 73. P. 515–531.
13. Cheng K.C., Demirci A., Catchmark J.M. // Pullulan: biosynthesis, production, and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2011. № 92. P. 29–44.
14. Ахмадышин Р.А., Канарский А.В., Канарская З.А., Сочкова И.Н., Грунин Л.Ю., Коптина А.В. Катализ в промышленности. 2008. № 4. с. 41- 42.
15. Ахмадышин Р.А., Канарский А.В., Канарская З.А. Ветеринарный врач. 2008. № 1. С. 11-15.
16. Pratima Bajrai // Biotechnology for Pulp and Paper Processing. Springer Science & Business Media. 2011. p 435.
17. Дайнеко И.П., Канарский А.В., Семенов Э.И., Канарская З.А. // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. Вып. 203. СПб.: СПбГЛТУ. 2013. с. 143 -155.
18. З.А. Канарская – КНИТУ, доцент каф. Пищ. БТ, к.т.н, zosya_kanarskaya@mail.ru
19. А.В. Канарский – КНИТУ, профессор каф. Пищ. БТ, д.т.н., alb46@mail.ru
20. В.К.Чеботарь - ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, заведующий лабораторией технологии микробных препаратов, к.б.н., bisolbi-inter@rambler.ru

21. А. В. Щербаков - ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, инженер-микробиолог лаборатории технологии микробных препаратов avsherbakov@bisolbi.ru.