

З. А. Канарская, А. В. Канарский, Д. А. Дулькин,
Э. И. Семенов, В. К. Чеботарь, А. В. Щербаков

БИОКОНВЕРСИЯ СТОЧНЫХ ВОД ПРОИЗВОДСТВА БУМАГИ С ПОЛУЧЕНИЕМ БАКТРИАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ МИКОТОКСИНОВ

Ключевые слова: сточные воды производства бумаги, биоконверсия, бактериальные полисахариды, энтеросорбенты, микотоксины.

Показано, что сточные воды бумажного производства могут быть основой питательной среды для культивирования чистых монокультур микроорганизмов, с получением внеклеточных полисахаридов. Ризосферные бактерии Azotobacter chroococum12, Xanthomonas sp.2, Agrobacterium radiobacter 437, Bacillus subtilis Ч - 13 эффективно синтезируют внеклеточные полисахариды на питательной среде, приготовленной на основе сточных вод бумажной фабрики, и обладают высокой адсорбционной способностью по отношению к Т - 2 микотоксину.

Key words: waste water of paper production, bacterial polysaccharides, enterosorbent, mycotoxins.

It is shown that the waste water of paper production can be the basis of the nutrient medium for the cultivation of pure monocultures of microorganisms to produce extracellular polysaccharides. Rhizosphere bacteria Azotobacter chroococum12, Xanthomonas sp.2, Agrobacterium radiobacter 437, Bacillus subtilis B - 13 to effectively synthesize extracellular polysaccharides in the culture medium was prepared on the basis of a paper mill waste water, and possess a high adsorption capacity with respect to T - 2 mycotoxin.

Актуальность работы

Обработка и утилизация сточных вод предприятий целлюлозно-бумажной промышленности являются технологически сложными процессами и экономически затратными [1, 2, 3, 4]. Современные очистные сооружения предприятий целлюлозно-бумажной промышленности, как, впрочем, и в других отраслях деятельности человека, по сути, представляют биоэкологические производства с образованием различных по природе и составу и далеко не безопасных отходов [5, 6]. Последние представлены, прежде всего, избыточным активным илом, который имеет специфические свойства, затрудняющие его последующее применение как продукта микробиологического синтеза [7, 8, 9, 10].

Экологическая ситуация определяется условиями складирования и хранения избыточного активного ила (как правило, в больших объемах) на территории очистных сооружений, приводящими к постоянному загрязнению подземных и поверхностных вод, а также почв прилегающих территорий [11, 12]. При этом складывается ситуация неопределенности и непредсказуемости развития событий, которые могут при наличии различных природных и антропогенных условий перерасти в экологическую катастрофу. Значительные объемы осадков на иловых картах нарушают технологический регламент работы очистных сооружений.

В результате возникают непредусмотренные технологией отвалы осадков вокруг территории очистных сооружений, что приводит к загрязнению окружающей среды вследствие активного контакта осадков из отвалов с прилегающими территориями и неконтролируемого использования их в качестве органического удобрения [13, 14].

В состав активного ила входят *Zoogloea* бактерии, дрожжи, грибы, простейшие и другие

организмы [15]. Эффективному развитию *Zoogloea* бактерий способствуют углеводы, присутствующие в сточных водах целлюлозно-бумажных предприятий. При этом зооглейные бактерии склонны к синтезу внеклеточных полисахаридов [16, 17, 18].

Следует отметить, что 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 (препарат «Реополиглюкин») [17]. Предложено использование альгинатов в качестве компонентов в системах адресной доставки лекарств [19]. 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 [17].

Полисахариды являются важнейшими компонентами клеток микроорганизмов [20]. 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) [21]. 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.

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 [20].

Экзогликаны бактерий используются при полимерном заводнении пласта нефти применение которых дает ощутимый экономический эффект [22]. Рынок водорастворимых полимеров в 1998 году составил 6,8 миллиардов долларов США. Спрос нефтедобывающей отрасли на бактериальные экзополисахариды только в США составляет цифру порядка 1 млн.т [17, 23].

Для решения проблем, связанных с содержанием микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных [24], в качестве адсорбентов микотоксинов рекомендуется использовать полисахариды микробиологического происхождения [25, 26]. В ранее проведенных авторами работах показана целесообразность использования клеточных стенок дрожжей для адсорбции микотоксинов [27, 28, 29].

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 [26]. 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 сточных вод, 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.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является биоконверсия сточных вод производства бумаги эндофитными, ризосферными и клубеньковыми бактериями с последующим получением на их основе эндосорбента микотоксинов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- определение состава сточных вод производства бумаги;
- определение влияния условий культивирования на рост бактерий на питательной среде, полученной из сточных вод производства бумаги;
- 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) и клубеньковых (*Rhizobium leguminosarum* 1082) бактерий, предоставленные Всероссийской коллекцией штаммов непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (<http://www.artiam.spb.ru>) и рабочей коллекцией лаборатории технологии микробных препаратов ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии. Выбор штаммов обусловлен их способностью продуцировать полисахариды при культивировании на твердых питательных средах. Именно в сточных водах бумажных фабрик присутствуют вещества растительного происхождения в 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, КН₂Р₄ -2,5, D – глюкоза - 2,5, вода дист.-1000 мл, рН 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 представлена характеристика сточных вод производства бумаги, используемой для приготовления питательной среды. Показатели определялись стандартными и рекомендованными методами, принятыми в целлюлозно-бумажной промышленности [3, 4, 5, 6].

Определение РВ в сточной воде проводилось методом Бертрана в модификации Шарля.

Таблица 1 - Характеристика сточных вод производства бумаги, используемой для приготовления питательной среды

рН	7,3
РВ, %	0,09
БПК5, мг О ₂ /дм ³	266
ХПК, мг О ₂ /дм ³	720
Взвешенные вещества, мг/дм	953
Сухой остаток, мг/дм	656

Культивирование бактерий проводили при рН 7,3 и 8,3. Для доведения рН 8,3 использовали мел в количестве 0,1 % от объема питательной среды. Дополнительные биогенные вещества в питательную среду не вводили. Условия культивирования бактерий на питательной среде, приготовленной на сточных водах производства бумаги 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 [25].

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 сточных вод производства бумаги, эффективно культивируются эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* TR6 и ризосферные бактерии *Bacillus subtilis* Ч - 13. При обоих значениях рН питательной среды титр этих бактерий соответствует титру этих бактерий в контроле.

Таблица 2 - Титр бактерий при культивировании на сточных водах производства бумаги*

Наименование микроорганизма	КОЕ/см ³	
	7,3	8,5
<i>Xanthomonas sp2</i>	1,10*10 ⁶	0,83*10 ⁹
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 437	1,15*10 ⁶	0,67*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	4,86*10 ⁹	6,86*10 ⁹
<i>Azotobacter chroococom</i> 12	1,37*10 ⁶	0,60*10 ⁸
<i>Bacillus subtilis</i> TR6.	0,11*10 ⁹	0,95*10 ⁹
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 1082	1,18*10 ⁶	0,12*10 ⁷

* Титр бактерий в контроле – 5,5 * 10⁹ КОЕ/мл.

Эффективность культивирования ризосферных бактерий *Azotobacter chroococom*12, *Xanthomonas sp.2*, *Agrobacterium radiobacter* 437 при

рН 8,5 питательной среды на порядок ниже эффективности культивирования этих бактерий в контроле (таблица 3). При этом культивирование указанных бактерий при рН 7,3 питательной среды на три порядка ниже эффективности культивирования в контроле.

На эффективность культивирования клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* 1082 рН питательной среды не влияет и титр бактерий на три порядка ниже титра в контроле.

Наиболее эффективно адсорбируют Т-2 микотоксин инактивированные ризосферные бактерии. Истинная адсорбция Т-2 микотоксина этими инактивированными бактериями значительно выше истинной адсорбции Т-2 микотоксина инактивированными дрожжами. Истинная адсорбция Т-2 микотоксина инактивированными клубеньковыми бактериями ниже по сравнению с ризосферными бактериями. Инактивированные эндофитные бактерии проявляют низкие адсорбционные свойства по отношению к Т-2 микотоксину.

Таблица 3 - Эффективность адсорбции Т-2 микотоксина инактивированными бактериями

Наименование адсорбента	рН 2	рН 8	Истинная адсорбция, %
	Адсорбции %	Десорбции, %	
<i>Xanthomonas sp2</i>	70	7,1	65
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 437	93	5,4	88,3
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	65	4,4	62,2
<i>Azotobacter chroococom</i> 12	80	2,5	78
<i>Bacillus subtilis</i> TR6	25	9,4	22,7
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 1082	71	6,1	51,7
<i>Candida scottii</i> штамм К-41	35	9,0	26,0
<i>S. cerevisiae</i> (ОАО«Буинский сахарный завод»)	35	2,3	32,7

Адсорбционные свойства бактерий определяются наличием внеклеточных полисахаридов. Следовательно, косвенно можно судить о том, что ризосферные бактерии, культивируемые на сточных водах бумажной фабрики эффективно синтезируют внеклеточные полисахариды по сравнению с эндофитными и клубеньковыми.

Заключение

1. Установлено, что на питательной среде, приготовленной на сточных водах производства бумаги, эффективно культивируются эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* TR6 и ризосферные бактерии *Bacillus subtilis* Ч - 13.

2. Инактивированная биомасса ризосферных бактерий *Azotobacter chroococom*12, *Xanthomonas sp.2*, *Agrobacterium radiobacter* 437,

Bacillus subtilis Ч - 13 обладает высокой адсорбционной способностью по отношению к Т-2 микотоксину. Наиболее эффективно Т-2 микотоксин адсорбируется активированными *Agrobacterium radiobacter* 437.

3. Истинная адсорбционная способность биомассы бактерий по отношению к Т-2 микотоксину выше адсорбционной способности дрожжей *Candida scottii* и *Saccharomyces cerevisiae*

4. Сточные воды производства бумаги рекомендуются использовать в качестве основы питательной среды для культивирования чистых монокультур микроорганизмов, с получением внеклеточных полисахаридов.

Литература

1. И.Ю. Заручевных, Дисс. к.т.н., Архангельск, 1999. – с. 149.
2. А.В. Богданов, Успехи современного естествознания, № 10. -2004. – с. 22 – 26.
3. С.С. Пузырев, О.П. Ковалева, Г.Н. Цветкова, Ю.А. Поляков, Целлюлоза. Бумага. Картон. Технология, № 8. – 2005.- с. 47 – 51.
2. А.М. Смирнов, М.Н. Смирнов, Э.Л. Аким Целлюлоза. Бумага. Картон. Экология, № 1. – 2005. – с. 70 – 75.
3. Т.Ф. Личутина, О.С. Бровка, М.А. Русакова, Л.Н. Парфенова, И.В. Белоглазов, Т.А. Дробежкина, Н.А. Рябов, Целлюлоза. Бумага. Картон. Экология, № 3. – 2005.- с. 66 – 69.
4. В.А. Волков, А.И. Камышев, Целлюлоза. Бумага. Картон. Управление, № 6. – 2005. – с.28 – 31.
5. Н.Г. Федорец, О.Н. Бахмет, Заводское хозяйство. Экология и промышленность России, апрель 2008. – с.13 – 15.
6. Г.И. Зубарева, М.А. Декова, А.В. Гуринович, Заводское хозяйство. Экология и промышленность России, июль 2006. – с.10 – 11.
7. Э.И. Федорова, Заводское хозяйство. Экология и промышленность России, декабрь 2007. – с. 4 – 5.
8. Б.С. Баталин, И.А. Козлов, Заводское хозяйство. Экология и промышленность России, июнь 2009. – с.20 – 22.
9. А.Д. Симонов, Н.А. Языков, А.В. Трачук, В.А. Яковлев, Международный научный журнал. Альтернативная энергия и экология. Катализ / № 6. – 2010. – с. 61 – 66.
10. С.Ив. Ноздрина, Дисс. к.с.н., Орел, 2004. - с. 142.
11. Т.Вл. Канунникова, Дисс. к.с.н., Курск, 2000. – с. 225.
12. Н.Г. Захаров, Дисс. к.с.н., Ульяновск, 2004. – с. 194.
13. А.И. Щетинин Водоснабжение и санитарная техника. Очистка сточных вод. – 2010. - №11.
14. О.М. Цивилева, Дисс. д.б.н., Саратов. – 2008. – с.358.
15. Г.Г. Худайгулов, Дисс. к.б.н. 2012. – Уфа. – 97 с.
16. С. Ах. М. Отман, Дисс. к.х.н., Москва. – 2012. – 106 с.
17. Ciofani, G; Raffa, V; Obata, Y, et al. Magnetic Driven Alginate Nanoparticles for Targeted Drug Delivery Pp. 212-218, 2008, Vol: 4-2
18. Г.Е. Рысмухамбетова, Дисс. к.б.н., Саратов.- 2009. – с.151.
19. West, T.P. Improved polysaccharide production using strain improvement / T. P. West // Microbial processes and products / ed. J. L. Barredo. - N.J.: Humana Press Inc. - 2005. - P. 301-311.
20. В.В. Литвин, М.В. Самойлов, Я.М. Каган, Б.М. Кудряшов, Бурение и нефть. – февраль 2010.
21. Shields, J. C., Sabra, B. M., Ho, L. C., Barth, A. J., & Filippenko, A. V. 2002, in ASP Conf. Ser. 255, Mass Outflow in Active Galactic Nuclei: New Perspectives, ed. D. M. Crenshaw, S. B. Kraemer, & I. M. George (San Francisco: ASP), 105.
22. А. Клименко, Корма и кормовые добавки. – 2010. – с. 57-58.
23. Н.И. Крюков, Дисс. д.б.н., Краснодар. – 2011. – 325 с.
24. Е. Я. Головня, Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 2 (2), 2009. – с.3 – 12.
25. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская, И.Н. Сочкова, Л.Ю. Грунин, А.В. Коптина, Катализ в промышленности, 2008, № 4, с. 41-42
26. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская, Ветеринарный врач. – 2008. - № 1. – С.11-15.
27. Т.А. Скотникова, Л.А. Неминуцкая, Н.К. Еремец, О.В. Провоторова, И.В. Бобровская, М.А. Малышева, З.А. Канарская, Вестник Казанского технологического университета. - № 4. – 2012. - с. 82 – 87.
28. Л.А. Неминуцкая, Т.А. Скотникова, Е.И. Титова, О.В. Провоторова, Н.К. Еремец, И.В. Бобровская, З.А. Канарская, Вестник Казанского технологического университета. - № 4. – 2012. - с. 69 – 74.

© З. А. Канарская – канд. техн. наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru; А. В. Канарский – д-р техн. наук, проф. той же кафедры, alb46@mail.ru; Д. А. Дулькин – д-р техн. наук, проф. САУ, dmdulkin@yandex.ru; Э. И. Семенов – канд. биол. наук, зав. лаб. Института радиологии и токсикологии, semyonovei@bk.ru; В. К. Чеботарь – канд. биол. наук, зав. лаб. Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, bisolbi-inter@rambler.ru; А. В. Щербakov – инженер-микробиолог лаб. технологии микробных препаратов Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, avsherbakov@bisolbi.ru.