

Э. И. Семенов, Л. Е. Матросова, Е. Ю. Тарасова,
З. А. Канарская

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АДсорБИРУЮЩЕЙ А КТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К МИКОТОКСИНАМ

Ключевые слова: дрожжи, совместное культивирование, адсорбция микотоксинов.

Показана адсорбция Т - 2 микотоксина инактивированными дрожжами. Установлено, что инактивированные дрожжи Saccharomyces cerevisiae - 11 обладают наибольшей эффективностью адсорбции Т - 2 микотоксина, что позволяет их использовать как адсорбент микотоксинов в виде кормовой добавки для профилактики микотоксикозов. Показано, что совместное культивирование дрожжей Saccharomyces cerevisiae - 11 и Issatchenkia orientalis - 96 может быть использовано для интенсификации роста дрожжей и повышения их выхода.

Key words: yeast, co-cultivation, the adsorption of mycotoxins.

Shows the adsorption of Т - 2 mycotoxin inactivated yeast. Found that inactivated yeast Saccharomyces cerevisiae - 11 are the most effective adsorption Т - 2 mycotoxin that allows their use as a mycotoxin adsorbent as a feed additive for the prevention of mycotoxicosis shown that co-cultivation of the yeast Saccharomyces cerevisiae - 11 and Issatchenkia orientalis - 96 can be used to intensify the growth of yeast and increase their output.

Последние десятилетия характеризуются возрастанием интереса применения биотехнологий во многих сферах деятельности человека. Среди разнообразия микроорганизмов, используемых в биотехнологической промышленности, привлекают внимания дрожжи. Рассматривая дрожжи как объект биотехнологии, следует отметить их условную патогенность для организма человека и животных, окружающей среды и «технологичность» - высокую скорость роста на широком спектре доступных для усвоения субстратах. Метаболический потенциал дрожжей не ниже, чем у других микроорганизмов, а ряд физиологических отличий, например, устойчивость к неблагоприятным факторам, имеет прикладной аспект. Дрожжи широко распространены в различных экологических нишах. Изучение дрожжей является перспективным направлением в биотехнологии.

На протяжении всей истории человечества известно широкое практическое применение дрожжей. Они используются в бродильных производствах для изготовления алкогольных напитков и хлеба, являются моделью для физиологических, молекулярных и генетических исследований, используются как продуценты многих важных для человека соединений – витаминов, липидов, нуклеиновых кислот, ферментов, органических кислот, спиртов, полисахаридов [1]. Широко используются дрожжевые культуры в биоремедиационных технологиях, очистки окружающей среды от ксенобиотиков [2, 3, 4, 5, 6].

Некоторые виды дрожжей используются в качестве агентов биоконтроля развития фитопатогенных микроорганизмов, выделяя вещества, подавляющие их рост [7, 8].

Дрожжи способны к биоадсорбции и биоаккумуляции тяжелых металлов с последующим образованием малотоксичных соединений [9, 10, 11].

Известно о способности дрожжей метаболизировать микотоксины и, соответственно, снижать их токсическое воздействие на организм [12, 13, 14, 15, 16].

В последнее десятилетие в нашей стране резко обострилась проблема микотоксикозов животных, представляющих собой чрезвычайно высокую экологическую и экономическую опасность. При скормливания животным кормов, загрязненных микотоксинами, регистрируются отдаленные последствия, снижение продуктивности, повышение заболеваемости и массовая гибель животных [17].

Проблема лечения и профилактики отравлений животных, вызываемых микотоксинами, остается весьма актуальной в ветеринарной токсикологии. Средства специфической профилактики и лечения, микотоксикозов до настоящего времени не разработаны. Наиболее распространенный метод защиты животных от микотоксинов – применение адсорбентов различного происхождения.

Наиболее совершенным адсорбентом микотоксинов, на наш взгляд, может стать клеточная стенка дрожжей. Клеточная стенка дрожжей составляет около 25 % сухой массы клетки. Полисахариды клеточной стенки (маннаны, глюкоманнаны) относятся к неперевариваемым. β - (1, 6) - глюканы дрожжей являются рецепторами киллер-токсинов, играющих, как известно, важную роль во взаимоотношениях между микроорганизмами [14, 18, 19, 20, 21].

Дрожжи характеризуются устойчивостью к микотоксинам, что предопределяет возможность их использования для детоксикации организма животных.

Учитывая перспективность применения дрожжей в качестве адсорбентов, следует отметить и необходимость совершенствования их технологии производства, направленную на прежде всего

повышение выхода дрожжей и, соответственно, снижение их себестоимости.

В биотехнологическом производстве стоимость сырья, входящего в состав питательных сред, доходит до 40 % от себестоимости продукта. В этой связи возникает необходимость увеличения выхода биомассы дрожжей, используемых в качестве адсорбентов микотоксинов, и, соответственно, снижения затрат на решение проблем с микотоксикозом животных.

Увеличение биомассы микроорганизмов наблюдается при совместном культивировании нескольких микроорганизмов. Выраженный эффект, в частности, отмечается у комплексных пробиотических препаратов, в которых бактериальные культуры дополняют друг друга по спектру антагонистического действия и по механизму влияния на макроорганизм [22].

Антагонистические свойства бактерий при межмикробных отношениях, в частности, в микросимбиозе, между доминантными и ассоциативными микроорганизмами, недостаточно охарактеризованы. Активация автолитических ферментов антагониста может стимулировать действие пептидогликанов бактерий-регуляторов [23]. На основе этих данных возможна разработка способов: отбора бактериальных препаратов с целью создания новых синбиотиков.

Показано ускорение роста *Saccharomyces cerevisiae* при совместном культивировании с *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. При этом, в зависимости от соотношения клеток в инокуляте отмечалось положительное, отрицательное и нейтральное влияние симбиоза на рост клеток. Стимулирующий эффект роста дрожжей, возможно, вызван воздействием специфических факторов, неспецифических экзометаболитов (витамины, аминокислоты и т.п.), выделяемых в среду пропионовыми бактериями [24]. Следует ожидать, что совместное культивирование не снизит адсорбционной способности биомассы дрожжей и бактерий. Ранее было показано, что бактерии обладают достаточно высокой адсорбционной способностью по отношению к микотоксинам [18, 19, 20, 21, 25].

Целью данной работы - оценка адсорбирующей активности инактивированных дрожжей в отношении Т - 2 токсина и изучение влияния совместного культивирования *Saccharomyces cerevisiae* - 11 с *Issatchenkia orientalis* - 96 на выход биомассы.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись различные таксономические группы дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* - 11, *Issatchenkia orientalis* - 96, *Candida tropicalis* - 99, *Candida pseudotropicalis* 44 пк, *Pichia jadinii* - 2008, *Rhodotorula glutinis* - 2003, *Torulopsis kefir* - 2006 из коллекции штаммов ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Дрожжи поддерживали в аэробных условиях на агаризованной среде Сабуро, содержащей (г/л дистиллированной воды):

глюкозу – 10.0,

пептон – 10.0,

дрожжевой экстракт – 5.0,

NaCl – 0.25,

агар – 20.0.

В последующем из питательной среды методом многократных центрифугирований и промывок получали взвесь микробных клеток, которую затем высушивали до влажности 10 - 12 % и в дальнейшем использовали для исследований.

Для экспериментальных исследований использовали кристаллический Т - 2 токсин, не отличающийся от существующих стандартов, полученный в лаборатории микотоксинов ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Качественное и количественное определение Т - 2 токсина проводили хроматографическими методами (ТСХ и ГЖХ). Т - 2 токсин является одним из наиболее токсичных и достаточно распространённых трихотеценовых микотоксинов типа А. По сравнению с другими микотоксинами, Т - 2 микотоксин относится к наименее адсорбируемым микотоксинам и поэтому результаты опытов с его использованием могут являться критерием оценки адсорбционных свойств адсорбентов микотоксинов [26].

Определение адсорбционной способности адсорбентов *in vitro* при pH = 7 (при температуре 37°C, в течение 30 минут) проводили по методике [27], которая учитывает специфику индикации Т - 2 токсина и прочность связывания. Изучение адсорбции проводили в десяти повторностях, за результат принимали их среднее значение.

При разработке способа увеличения выхода дрожжевой биомассы объектами исследования являлись дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*-11 и *Issatchenkia orientalis* - 96. Изоляты *Issatchenkia orientalis* – 96 и *Saccharomyces cerevisiae* - 11 выделены в 1996 и 2011 году сотрудниками «ФЦТРБ-ВНИВИ» из компостных куч.

Культуры выращивали на среде следующего состава:

пептон - 10 г/л,

глюкоза - 20 г/л,

pH – 5,6 ± 0,2.

Температура культивирования составила 30°C.

Культуры *Saccharomyces cerevisiae* - 11 и *Issatchenkia orientalis* вводили в среду одновременно, в соотношении 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 1 : 2, 1 : 3. Первоначальная посевная доза инокулята составила 6,0 ± 0,01 lg КОЕ/мл.

Результаты исследований

Результаты изучения адсорбирующей активности инактивированных дрожжей в отношении Т - 2 токсина представлены в таблице 1.

Из приведённых в таблице данных, следует, что все взятые в опытах инактивированные дрожжи обладают в той или иной степени способностью адсорбировать Т – 2 микотоксин. Так более активно связывают Т - 2 микотоксин микробные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - 11 (78,8 %), рода *Candida* (62,8 - 72,1 %), менее *Torulopsis kefir* - 2006 (47,9 %).

Таблица 1 - Адсорбирующая активность дрожжей в отношении Т - 2 токсина

Исследуемые штаммы	Адсорбция, %	Десорбция, %
<i>Issatchenkia orientalis</i> - 96	70,6	7,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - 11	78,8	5,7
<i>Candida tropicalis</i> - 99	62,8	6,1
<i>Candida pseudotropicalis</i> 44 нк	72,1	4,6
<i>Pichia jadinii</i> - 2008	63,7	11,4
<i>Rhodotorula glutinis</i> - 2003	59,3	5,7
<i>Torulopsis kefir</i> - 2006	47,9	0,67

Таким образом, инактивированные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - 11, обладают большей эффективностью адсорбции Т - 2 токсина, что позволяет их использовать как адсорбент микотоксинов в виде кормовой и пищевой добавки для профилактики отравлений микотоксинами.

Выращивание в монокультуре показало, что *Saccharomyces cerevisiae* - 11, в отличие от *Issatchenkia orientalis* - 96 быстрее накапливает биомассу. На 72 ч культивирования количество клеток составила $16,0 \pm 1,2$ lg КОЕ/мл.

При совместном культивировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - 11 и *Issatchenkia orientalis* - 96 (соотношении клеток *Saccharomyces cerevisiae* - 11 - *Issatchenkia orientalis* - 96 в посевном материале 3:1) отмечен стимулирующий эффект. Активный рост сахаромикета происходил на 12 ч раньше, чем в монокультуре и позволил получить культуральную жидкость с титром $25,1 \pm 2,3$ lg КОЕ/мл.

Результаты исследований показали, что совместное культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - 11 и *Issatchenkia orientalis* - 96 может быть использовано для интенсификации роста дрожжей и повышения их выхода.

Литература

1. И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК. 221 с. (2004).
2. С.А. Зарипов, А.В. Наумов, Е.В. Никитина. Микробиология. Т. 71. С. 648 – 653. (2002).
3. А.М. Зиганин, Р. Герлах, Е.А. Науменко. Микробиология. Т. 79. № 2. С. 199–205. (2010).
4. А.М. Зиганин, А.В. Наумов, Е.С. Суворова. Микробиология. Т. 76. С. 766 – 773. (2007).
5. Л.Е. Матросова, М.Я. Трмасов, А.А. Иванов. Ветеринария. № 10. С. 42 - 43. (2012).
6. Bankar A., Kumar A., Zinjarde S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica* // Appl. Microbiol. Biotechnol. № 4. P.847 - 865. (2009).

7. Л.В. Коломбет. Микробиология и фитопатология. Т. 39. № 5. С. 81 - 89. (2005).
8. D.A. Schicler, N.I. Klan, M.J. Boehm et al. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. Plant Dis. V. 86. P. 1350 - 1356. (2002).
9. Р.А. Гаранин, И.Н. Лыков. «Вестник» при МГТУ им. Н.Э. Баумана из цикла «Естественные науки». № 1. С. 110-119. (2008).
10. Silvana A. Isotermas de adsorcao de cadmio por *Saccharomyces cerevisiae* // Cienc. Tecnol. Aliment. Vol.21. №2. P.134 - 138. (2001).
11. Adamis P. Factors involved with cadmium absorption by a wildtype strain of *Saccharomyces cerevisiae* // Braz. J. Microbiol. Vol.34. № 1. P.55 - 60. (2003).
12. Н.А. Мучкаева, О.Д. Доронина, И.В. Волкова. Всесоюз. научн.- техн. конф. Тезисы докладов. Кемерово. С. 199 - 200. (1991).
13. О.П. Кобзиста. Современные проблемы токсикологии. № 1. С. 39 - 41. (2001).
14. Cardner P., Stanley V.G., Hutchincjn D.M. Use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress aflatoxin effects in broiler chick ration // Poultry Science. V. 71. P. 49. (1992).
15. V.G. Stanley, Raphael Qjo, Selamawit Woldesenbet, Dencle H. Hutchinson The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks // Poultry Science. V. 72. No. 10. P. 1867 - 1872. (1993).
16. Engler Kathryn H., Coker Raymond D., Evans Jvor H. Uptake of aflatoxin B1 and T-2 toxin by two mycotoxins bioassay microorganisms: *Kluyveromyces marxianus* and *Bacillus megaterium*//Arch. Microbiol. V. 174. No. 6. P. 381-385. (2000).
17. А.В. Иванов, М.Я. Трмасов, К.Х. Папуниди, А.К. Чулков Микотоксикозы животных (этиология, диагностика, лечение, профилактика). М.: Колос. 140 с. (2008).
18. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская. Вестник Казанского технол. универ. № 2. С. 88 - 102. (2007).
19. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская. Вестник Казанского технол. универ. № 3 - 4. С. 127 - 129. (2007).
20. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская. Вестник Казанского технологического университета. № 5. С. 83 - 85. (2007).
21. Р.А. Ахмадышин, А.В. Канарский, З.А. Канарская, Э.И. Семёнов Ветеринарный врач. № 1. С. 11 - 12. (2008).
22. И.Г. Царукьянова, А.И. Осадчая, Микробиол. журн. Т. 69. №2. С.43 - 49 (2007).
23. И.В. Данилова, Т.В. Быковченко, Е.П. Рыжкова. Прикладная биохимия и микробиология. Т. 42. № 4. С.428 - 433 (2006).
24. Yeast: a practical approach / Eds. I. Campbell, J.H. Duffus. Oxford, Washington: IRL Press, 289 p. (1988).
25. А.В. Канарский, З.А. Канарская, Д.А. Дулькин, Э.И. Семенов, В.К. Чеботарь, А.В. Шербаков. Вестник Казанского технол. универ. Т. 15. № 14. С. 186 – 190. (2012).
26. Э.И. Семёнов. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Казань. 26 с. (2006).
27. Э.И. Семенов, Н.Н. Курбанова. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные проблемы ветеринарии». Казань. С. 53 - 54. (2007).