

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛЕКЦИИ «ПОЛЕВЫХ» КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ

Майоров Павел Сергеевич, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ляшенко Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, Ульяновская область, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

тел.: +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Ключевые слова: бактерии, целлюлоза, активность, свойства, целлюлолитическая активность.

Разложение органических веществ широко распространено во всех типах почв и играет важную роль в круговороте углерода. Разложение целлюлозы играет особую роль, поскольку целлюлоза является наиболее распространенным полисахаридом в растительных остатках и может быть использована новыми растениями в виде более простых соединений. При этом скорость разложения растительных остатков в почве занимает значительное время и во многом зависит от типа почвы и ее микробного состава. Использование отдельных наиболее активных микроорганизмов в составе биопрепаратов может позволить повысить плодородию почвы, особенно в тех зонах, где изначальный состав микрофлоры не способствует активному разложению растительных остатков. В данном исследовании проведено изучение и сравнение целлюлолитической активности различных штаммов микроорганизмов, выделенных из почвы. Объектами исследования являлась коллекция из 56 штаммов. Изучение целлюлолитической активности проводилось на питательных средах, содержащих источник целлюлозы с использованием красителя конго ред. Полученные результаты показали различный уровень целлюлолитической активности у исследуемых штаммов. В отдельных случаях отмечалось повышение активности со снижением количества бактериальных клеток. 18 из 56 штаммов продемонстрировали деградацию целлюлозы только в пределах роста колоний бактерий. По итогам исследований было отмечено 6 штаммов микроорганизмов с наибольшей зоной целлюлолитической активности, достигавшей радиуса в 15 мм вокруг выросшей колонии. Среди наиболее активных штаммов лишь один являлся грамотрицательной бактерией, в то время как остальные относились к грамположительным микроорганизмам.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году. Регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 122030200368-5

Введение

Экосистема почвенных микроорганизмов является функционально сложной. Почвенные микроорганизмы играют огромную роль в плодородии почвы, перерабатывая основные питательные вещества растений путем разложения и минерализации органических углеродсодержащих ингредиентов [1-2]. Целлюлоза, которая составляет примерно $1,5 \times 10^{12}$ тонн годовой биомассы, образующейся в результате фотосинтеза, является наиболее распространенным органическим полимером и считается почти неисчерпаемым источником сырья для различных продуктов [3]. Кроме того, гемицеллюлозы, которые состоят из гетерогенной группы полисахаридов, включающей ксиланы, β -глюканы и ман-

наны, также являются важными компонентами клеточных стенок растений [4]. Из-за их обилия переработка лигноцеллюлозных материалов необходима для углеродного цикла и требует многочисленных трудоемких процессов, которые включают механическую, химическую термическую и биологическую обработку [5]. Деградация лигноцеллюлозных материалов в их естественной среде протекает исключительно в результате биологических процессов [6], поэтому изучение микробных сообществ, населяющих компост, и выяснение их роли в биодеградации органических компонентов является важным шагом для улучшения процессов компостирования [7].

Во время компостирования многочисленные виды микроорганизмов влияют на биологическую деградацию отходов. Целлюлолитические и гемицеллюлолитические бактерии были выделены из широкого спектра сред, таких как почва, компосты, разлагающиеся растительные отходы и фекалии жвачных животных [8-9]. Биодegradация отходов происходит в результате согласованного действия различных микроорганизмов, которые продуцируют ряд ферментов, способствующих процессу биоаконверсии [10]. Эти ферменты включают целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы, которые действуют синергически, разрушая сложные молекулы клеточной стенки [11-12].

Целью настоящей работы являлось изучение целлюлолитической активности коллекции микроорганизмов, выделенных из образцов почвы.

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы

В данной работе использовали коллекцию штаммов, выделенных из почвы в весенне-летний промежуток 2022 года на территории Ульяновской области и включающей 56 штаммов различных видов и родов.

Питательные среды:

Среда Гетчинсона следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaNO_3 - 2,5; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; NaCl — 0,1; CaCl_2 — 0,1; FeCl_3 — 0,01; pH среды доводят до 7,2 добавлением 20%-ного раствора Na_2CO_3

Пептонная среда: пептон ферментативный - 10 г; NaCl - 5 г.

В качестве источника целлюлозы в каждую среду добавляли 1% карбоксиметилцеллюлозы (СМС).

Приборы и оборудование: лабораторная бактериологическая посуда, водяная баня, термометр ртутный, дистиллятор, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС – 80, автоклав ГК-100-3, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС-80М-2.

Оценка целлюлолитической активности

Разложение целлюлозы исследовали на пептонной среде и среде Гетчинсона с добавлением 1% СМС. Высев исследуемых микроорганизмов проводили в нескольких разведениях для оценки снижения целлюлолитической активности со снижением количества бактериальных клеток. Для оценки целлюлолитической активности после инкубирования исследуемого штамма на выбранных средах в течение 24 ча-

сов на чашки наносили 1% раствор конго красного, выдерживали в течение 15 минут, после чего на чашки наносили 10% раствор NaCl и выдерживали еще 10 минут. В отдельных случаях вместо конго красного наносился раствор Люголя без последующей промывки раствором NaCl . Активность определяли по величине зон просветления на питательной среде [13-14].

Результаты исследований

Проведенные исследования показали, что все используемые штаммы обладали различным уровнем целлюлолитической активности и по-разному проявляли ее при снижении концентрации бактериальных клеток (рис.). В ходе эксперимента на чашку высевали до 6 разведений исследуемой суточной культуры бактерий. 18 штаммов из 56 проявляли целлюлолитическую активность только в месте роста бактериальных колоний, в то время как остальные имели зоны просветления вокруг колоний после проведения соответствующей процедуры. Обобщенные данные по целлюлолитической активности приводим в таблице .

Стоит отметить, что использование раствора Люголя позволяло в отдельных случаях выявить зоны просветления гораздо лучше, чем конго красный, даже после нанесения последнего. Полученные результаты показали, что целлюлолитическая активность проявлялась по-разному. У одних штаммов она практически не изменялась с изменением количества бактериальных клеток (П5.1). У других происходило снижение активности со снижением начальной концентрации бактериальных клеток (П9.3). В третьем же случае наблюдали, наоборот, рост активности бактерий со снижением титра (П17.41). Обусловлено это может быть более разряженным ростом отдельных колоний на питательной среде.

Из данных таблицы 1 видно, что наиболее большие зоны целлюлолитической активности были отмечены у штаммов П5.1, П7.3, П40.11, П17.41, П45.11 и П9.3. Отметим, что среди перечисленных имелись в основном грамположительные бактерии (исключением являлся штамм П5.1)

Обсуждение

Поиск наиболее активных целлюлолитиков в настоящее время имеет актуальное значение, поскольку применение биологических препаратов, в том числе на основе бактерий, позволяет сельскохозяйственным предприятиям снизить зависимость от химических удобрений

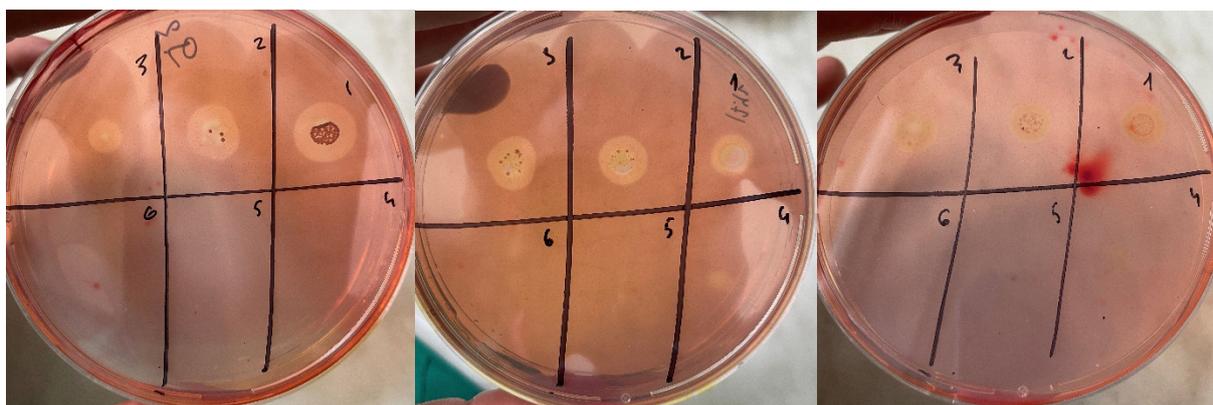


Рис. - Ферментативной активностью в отношении целлюлозы при изменении титра высеваемой культуры (слева-направо штаммы: П9.3, П17.41, П5.1)

Таблица

Размер зоны целлюлолитической активности выделенных штаммов

Название штамма	Радиус пятна, мм						
П4.12	1	П7.2	1,5	П26.21	0,2	П1.1	1
П1.5	3	П10.2	0,5	П58.2	0,5	П10.7	3
П19.1	5	П5.1	7	П9.5	2	П17.22	1
П33.21	0,3	П5.31	2	П7.3	15	П1.3	1,5
П17.33	2	П10.41	1	П2.1	0,5	П22.2	0,5
П5.32	0,5	П8.3	2	П19.1	3	П57.21	4
П40.51	6	П1.4	2	П48.1	7	П17.31	4
П40.11	11	П45.11	8	П4.11	0,5	П9.3	10
П17.41	12	П17.32	2,5	Т8.2	1,5	П20.61	0,1
П17.42	9	П17.34	1	Т8.3	0,5	П35.12	0,8
П4.2	1	П10.1	2	П8.2	1,5	П1.2	2
П5.4	1	П8.4	0	П17.21	1	П15.1	1
П10.42	3	Т8.1	1	П10.3	1	П6.1	3
П52.3	0,9	П57.12	0,5	Т8.1	0,6	Т4	0,3

и использовать в качестве удобрения те растительные остатки, которые остаются в почве после выращивания различных культур растений. Естественные процессы, протекающие в почве, позволяют переводить целлюлозы в более простые и доступные для растений формы, однако скорость таких процессов во многом не позволяет интенсифицировать процессы выращивания сельскохозяйственных культур, по крайней мере без внесения дополнительных и максимально активных в отношении целлюлозы микроорганизмов. Проведенные исследования позволяют отобрать наиболее интересные штаммы для их последующего изучения в качестве компонентов биопрепарата, однако стоит оговориться, что используемые методы позволяют оценить целлюлолитическую активность лишь приблизительно и только в лабораторных условиях.

Заключение

В рамках проведенных исследований изучена целлюлолитическая активность 56 штам-

мов бактерий, выделенных из почвы. Отмечено, что снижение начальной концентрации не всегда приводило к снижению целлюлолитической активности, а в отдельных случаях наоборот, приводило к ее возрастанию. При этом 18 исследованных штаммов проявляли целлюлолитическую активность слабо, о чем свидетельствовали незначительные зоны просветления вокруг выросших колоний (до 1 мм). По итогам проведенных исследований были отмечены штаммы П5.1, П7.3, П40.11, П17.41, П45.11 и П9.3 как наиболее активные и с которыми будет продолжена работа в дальнейшем.

Библиографический список

1. Inhibition of nodulation and nitrogen nutrition of leguminous crops by selected heavy metals / S. A. Haddad, M. A. Tabatabai, A. A. Abdel-Moneim, T. E. Loynachan // Air Soil Water Res. – 2015. - № 8. – P. 1–7.
2. Effect of heavy metals pollution on soil mi-

crobial diversity and ber-mudagrass genetic variation / Y. Xie, J. Fan, W. Zhu, E. Amombo, Y. Lou, L. Chen, J. Fu // *Front Plant Sci.* – 2016. - № 7. - P. 755.

3. Sukumaran, R. K. Microbial cellulases - Production, applications and challenges / R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, A. Pandey // *J Sci Ind Res.* - 2005. - № 64. – P. 832–844.

4. Chen, H. Sequencing of a 1,3-1,4-β-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin / H. Chen, X.-L. Li, L. G. Ljungdahl // *J Bacteriol.* – 1997. - № 179. – P. 6028–6034.

5. Malherbe, S. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications / S. Malherbe, T. E. Cloete // *Rev Environ Sci Biotechnol.* – 2002. - № 1. – P. 105–114.

6. Chidthaisong, A. Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil / A. Chidthaisong, R. Conrad // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2000. - № 31. – P. 87–94.

7. Maki, M. L. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers / M. L. Maki // *International journal of biochemistry and molecular biology.* - 2011. - № 2(2). - P. 146-154.

8. Maki, M. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellu-

losic biomass / M. Maki, K. T. Leung, W. Qin // *Int J Biol Sci.* – 2009. - № 5. – P. 500–516.

9. Screening for cellulose and hemicellulose degrading enzymes from the fungal genus *Ulocladium* / M. Pedersen, M. Hollensted, L. Lange, B. Andersen // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 2009. - № 63. – P. 484– 489.

10. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Perez, J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia, J. Martínez // *Int Microbiol.* – 2002. - № 5. - P. 53–63.

11. Doi, R. H. Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome and noncellulosome producers / R. H. Doi // *Ann NY Acad Sci.* – 2008. - № 1125. – P. 267–279.

12. Miller, M. E. B. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* / M. E. B. Miller // *FD-1. PLOS One.* - 2009. - № 4(8).

13. Teather, R. M. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument / R. M. Teather, P. J. Wood // *Applied and environmental microbiology.* – 1982. - Vol. 43, № 4. - P. 777-780.

14. Dashtban, M. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison / M. Dashtban // *Critical reviews in biotechnology.* - 2010. - P. 1-8.

STUDY OF THE CELLULOLYTIC ACTIVITY OF A COLLECTION OF “FIELD” BACTERIAL CULTURES

Maivorov P.S., Feoktistova N.A., Lyashenko E.A., Suldina E.V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk region, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1

tel .: +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Key words: bacteria, cellulose, activity, properties, cellulolytic activity.

Decomposition of organic substances is widespread in all types of soils and plays an important role in the carbon cycle. The decomposition of cellulose plays a special role, since cellulose is the most common polysaccharide in plant residues and can be used by new plants in the form of simpler compounds. At the same time, the rate of decomposition of plant residues in the soil takes a considerable time and largely depends on the type of soil and its microbial composition. The use of individual most active microorganisms in the composition of biological products can increase soil fertility, especially in those areas where the original composition of the microflora does not contribute to the active decomposition of plant residues. In this study, the cellulolytic activity of various strains of microorganisms isolated from the soil was studied and compared. The objects of the study were a collection of 56 strains. The study of cellulolytic activity was carried out on nutrient media containing a cellulose source using congo dye ed. The obtained results showed a different level of cellulolytic activity in the studied strains. In some cases, there was an increase in activity with a decrease in the number of bacterial cells. 18 of 56 strains demonstrated cellulose degradation only within the limits of bacterial colony growth. According to the results of the studies, 6 strains of microorganisms with the largest zone of cellulolytic activity, reaching a radius of 15 mm around the grown colony, were noted. Among the most active strains, only one was Gram-negative bacteria, while the rest were gram-positive microorganisms.

Bibliography:

1. Inhibition of nodulation and nitrogen nutrition of leguminous crops by selected heavy metals / S. A. Haddad, M. A. Tabatabai, A. A. Abdel-Moneim, T. E. Loynachan // *Air Soil Water Res.* – 2015. - № 8. – P. 1–7.

2. Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and ber-mudagrass genetic variation / Y. Xie, J. Fan, W. Zhu, E. Amombo, Y. Lou, L. Chen, J. Fu // *Front Plant Sci.* – 2016. - № 7. - P. 755.

3. Sukumaran, R. K. Microbial cellulases - Production, applications and challenges / R. K. Sukumaran, R. R. Singhanian, A. Pandey // *J Sci Ind Res.* - 2005. - № 64. – P. 832–844.

4. Chen, H. Sequencing of a 1,3-1,4-β-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin / H. Chen, X.-L. Li, L. G. Ljungdahl // *J Bacteriol.* – 1997. - № 179. – P. 6028–6034.

5. Malherbe, S. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications / S. Malherbe, T. E. Cloete // *Rev Environ Sci Biotechnol.* – 2002. - № 1. – P. 105–114.

6. Chidthaisong, A. Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil / A. Chidthaisong, R. Conrad // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2000. - № 31. – P. 87–94.

7. Maki, M. L. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers / M. L. Maki // *International journal of biochemistry and molecular biology*. - 2011. - № 2(2). - P. 146-154.
8. Maki, M. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass / M. Maki, K. T. Leung, W. Qin // *Int J Biol Sci*. – 2009. - № 5. – P. 500–516.
9. Screening for cellulose and hemicellulose degrading enzymes from the fungal genus *Ulocladium* / M. Pedersen, M. Hollensted, L. Lange, B. Andersen // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 2009. - № 63. – P. 484– 489.
10. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Perez, J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia, J. Martínez // *Int Microbiol.* – 2002. - № 5. - P. 53–63.
11. Doi, R. H. Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome and noncellulosome producers / R. H. Doi // *Ann NY Acad Sci.* – 2008. - № 1125. – P. 267–279.
12. Miller, M. E. B. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* / M. E. B. Miller // *FD-1. PLOS One*. - 2009. - № 4(8).
13. Teather, R. M. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument / R. M. Teather, P. J. Wood // *Applied and environmental microbiology*. – 1982. - Vol. 43, No. 4. - P. 777-780.
14. Dashtban, M. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison / M. Dashtban // *Critical reviews in biotechnology*. - 2010. - P. 1- 8.