

doi:10.18286/1816-4501-2024-3-133-137
УДК 579.64

Изучение целлюлозолитической активности коллекции «полевых» культур бактерий

П. С. Майоров, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Е. А. Ляшенко, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Н. А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

✉ pavelmayorovv@yandex.ru

Резюме. Исследование проведено с целью изучения целлюлозолитической активности коллекции микроорганизмов, выделенных из образцов почвы для отбора наиболее перспективных штаммов и конструирования на их основе биопрепарата. Объектами исследований являлись 56 штаммов. Определение целлюлозолитической активности проводили на питательных средах, содержащих источник целлюлозы с использованием красителя конго красный. Определили различный уровень целлюлозолитической активности у исследуемых штаммов. В отдельных случаях у 8 штаммов бактерий отмечали повышение активности в среднем на 10 % со снижением количества бактериальных клеток. 15 из 56 штаммов продемонстрировали деградацию целлюлозы только в пределах роста колоний бактерий. Выявили 6 штаммов микроорганизмов с наибольшей зоной целлюлозолитической 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. Изменение начального титра штаммов бактерий разнонаправлено влияло на целлюлозолитическую активность. У 8 штаммов бактерий снижение их начального титра с 10^8 КОЕ/мл до 10^6 КОЕ/мл приводило к ее повышению. У 21 штамма изменений в уровне целлюлозолитической активности практически не отмечали. У 27 штаммов вслед за снижением их начального титра было отмечено снижение и активности в отношении источника целлюлозы. Отобраны 4 штамма бактерий, обладающих высоким уровнем целлюлозолитической активности и сохраняющих ее при снижении начального бактериального титра. Данные штаммы бактерий будут использованы в качестве основы для конструирования биопрепарата и дальнейших исследований по деструкции целлюлозы в естественных условиях.

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

Для цитирования: Майоров П. С., Ляшенко Е. А., Феоктистова Н. А. Изучение целлюлозолитической активности коллекции «полевых» культур бактерий // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №3 (67). С. 133-137. doi:10.18286/1816-4501-2024-3-133-137

The study the cellulolytic activity of a collection of "soil" bacterial cultures

P. S. Maiorov, E. A. Lyashenko, N. A. Feoktistova

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017 Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard 1

✉ pavelmayorovv@yandex.ru

Abstract. The research was conducted in order to study the cellulolytic activity of a collection of microorganisms isolated from soil samples for the selection of the most promising strains and the construction of a biological product based on them. The objects of research were 56 strains. The cellulolytic activity was determined on nutrient media containing a cellulose source using the Congo red. Different levels of cellulolytic activity were determined in the studied strains. In some cases, 8 bacterial strains showed an increase in activity by an average of 10% with a decrease in the number of bacterial cells. 15 of the 56 strains demonstrated cellulose degradation only within the limits of bacterial colony growth. 6 strains of microorganisms with the largest zone of cellulolytic activity, reaching a radius of 15 mm around the grown colony, were identified. Among the most active strains, only one was Gram-negative bacteria, while the rest were gram-positive microorganisms. The change in the initial titer of bacterial strains had a multidirectional effect on cellulolytic activity. In 8 bacterial strains, a decrease in their initial titer from 10^8 CFU/ml to 10^6 CFU/ml led to its increase. There were practically no changes in the level of cellulolytic activity in 21 strains. In 27 strains, following a decrease in their initial titer, a decrease in activity against the cellulose source was also noted. 4 bacterial strains with a high level of

cellulolytic activity and retaining it with a decrease in the initial bacterial titer were selected. These bacterial strains will be used as the basis for the design of a biological product and further research on the destruction of cellulose in vivo.

Keywords: bacteria, cellulose, activity, properties, cellulolytic activity.

For citation: Maiorov P.S., Lyashenko E.A., Feoktistova N.A. The study the cellulolytic activity of a collection of "soil" bacterial cultures // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;3(67): 133-137 doi:10.18286/1816-4501-2024-3-133-137

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 маннаны, 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 обработки [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. Целлюлозолитические и гемицеллюлозолитические бактерии были выделены из широкого спектра сред, таких как почвы, компосты, разлагающиеся растительные отходы и фекалии жвачных животных [8-9]. Биодеградация отходов происходит в результате согласованного действия различных микроорганизмов, которые продуцируют ряд ферментов, способствующих процессу биоконверсии [10]. Эти ферменты включают целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы, которые действуют синергически, разрушая сложные молекулы клеточной стенки [11-12].

Цель исследований – изучения целлюлозолитической активности коллекции микроорганизмов, выделенных из образцов почвы, для отбора наиболее перспективных штаммов и конструирования на их основе биопрепарата.

Материалы и методы

В работе использовали коллекцию штаммов, выделенных из почвы в весенне-летний промежуток 2022 г. на территории Ульяновской области и включающей 56 штаммов различных видов и родов [13].

Питательные среды:

- среда Гетчинсона (г/л дистиллированной воды): NaNO_3 - 2,5; KH_2PO_4 - 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 (г/л дистиллированной воды): пептон - 10,0; NaCl – 5,0.

В качестве источника целлюлозы в каждую среду добавляли по 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 целлюлозолитической активности

Разложение целлюлозы исследовали на пептонной среде и среде Гетчинсона с добавлением 1 % СМС. Эксперимент проводили в 2-х вариациях путем посева бактерий методом спот-теста. В первой посев бактерий в объеме 0,1 мл и в концентрации 10^8 КОЕ/мл проводили на среду Гетчинсона. После культивирования определяли размер зон просветления вокруг колоний. Во второй вариации производили посев исследуемых микроорганизмов на пептонную среду с СМС в нескольких разведениях для оценки изменения целлюлолитической активности со снижением количества бактериальных клеток. Для оценки целлюлозолитической активности после инкубирования исследуемых штаммов на выбранных питательных средах в течение 24 ч. 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 наносили раствор Люголя. Активность определяли по величине зон просветления на питательной среде [14-15].

Результаты

Выявили, что 15 штаммов из 56 проявляли целлюлозолитическую активность только непосредственно в месте роста бактериальных колоний, в то время, как остальные имели зоны просветления вокруг колоний после внесения на поверхность среды красителя конго красного (табл. 1).

Наибольшие зоны целлюлозолитической активности были отмечены у штаммов П5.1, П7.3, П40.11, П17.41, П45.11 и П9.3. У этих штаммов отмечали превышение размеров зон целлюлозной активности над размерами выросших колоний (4...6 мм). Среди перечисленных имелись в основном грамположительные бактерии (исключение – штамм П5.1). При изучении 15 штаммов бактерий

(П33.21, П5.32, П52.3, П10.2, П57.12, П26.21, П58.2, П2.1, П4.11, Т8.3, Т8.1, П22.2, П20.61, П35.12, Т4) наблюдали проявление целлюлозолитической активности в пределах роста бактериальных колоний (размер зон активности не превышал 1 мм). Оставшиеся 35 штаммов проявляли средний уровень целлюлозолитической активности (размер зон активности - от 1 мм до 7 мм).

Вторая часть исследования была направлена на изучение влияния начальной концентрации бактерий на изменение целлюлозолитической

активности. У используемых в работе штаммов бактерий по-разному изменялась целлюлозолитическая активность при снижении титра используемой бактериальной суспензии (рис. 1). В ходе эксперимента на чашку высевали до 6 разведений исследуемой суточной культуры бактерий ($10^3 \dots 10^8$ КОЕ/мл). Так, при использовании бактериальных штаммов в концентрации $10^3 \dots 10^5$ КОЕ/мл в течение 24 ч. отсутствовал рост видимых колоний бактерий, также как отсутствовала целлюлозолитическая активность.

Таблица 1. Размер зоны целлюлозолитической активности выделенных штаммов

Название штамма	Радиус пятна, мм	Название штамма	Радиус пятна, мм	Название штамма	Радиус пятна, мм	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	9	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	9	П4.11	0,5	П9.3	10
П17.41	12	П17.32	2,5	Т8.2	1,5	П20.61	0,1
П17.42	7	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

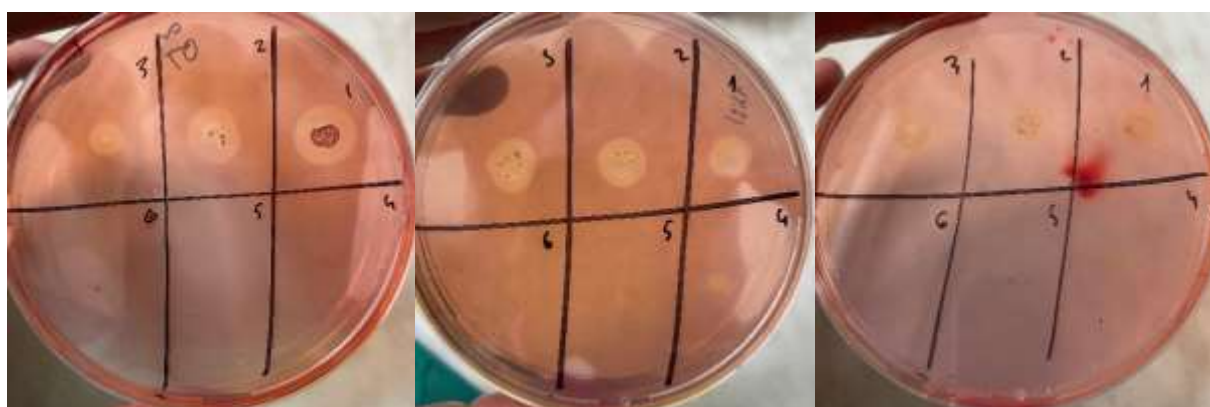


Рис. 1 – Ферментативная активность в отношении целлюлозы при изменении титра высеваемой культуры (слева-направо штаммы: П9.3, П17.41, П5.1)

У одних штаммов целлюлозолитическая активность практически не изменялась с изменением концентрации 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). Это может быть обусловлено более разряженными ростом отдельных колоний на питательной среде. По итогам проведенного эксперимента было принято решение разделить все исследуемые штаммы на 3 группы в зависимости от изменения целлюлозолитической активности при снижении бактериального титра. В 1 группу вошли штаммы, у которых отмечали повышение

целлюлозолитической активности с понижением бактериального титра (П17.33, П17.41, П5.4, П5.31, П45.11, П9.5, Т8.2, Т8.1). Во вторую группу включены штаммы бактерий, у которых отмечали изменение целлюлозолитической активности в пределах 5% от начального уровня. И в 3 группу включены штаммы, у которых отмечено снижение целлюлозолитической активности. На графике представлена сводная информация по сформированным группам в проведенном эксперименте (рис.2).

В 1 группе (8 штаммов) в среднем наблюдали увеличение зон целлюлозолитической активности на 10 % при снижении начального титра бактериальных суспензий до 10^6 КОЕ/мл. Вторая группа

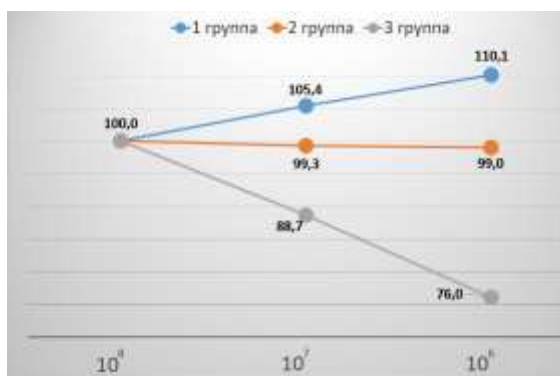


Рис. 2 – Изменение целлюлозолитической активности бактерий при изменении бактериального титра

(21 штамм) показала сохранение уровня целлюлозолитической активности при изменении бактериального титра, снижение активности происходило в среднем в пределах 1 %. В 3 группе (27 штаммов) отмечали снижение целлюлозолитической активности в среднем на 24 %.

Объединяя результаты двух экспериментов из 56 используемых в работе штаммов бактерий, удалось отобрать 4 штамма с наилучшими свойствами. У штаммов П5.1, П7.3, П17.41 и П45.11 помимо наилучшей целлюлозолитической активности отмечалось и отсутствие значительного ее снижения при изменении начального бактериального титра.

Обсуждение

Поиск наиболее активных целлюлозолитиков в настоящее время имеет актуальное значение, поскольку применение биологических препаратов в том числе на основе бактерий позволяет сельскохозяйственным предприятиям снизить зависимость от химических удобрений и использовать в качестве удобрения те растительные остатки, которые остаются в почве после выращивания различных культур растений [13]. 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 [8]. Кроме того, важно не только абсолютное значение целлюлозолитической активности микроорганизмов, но и ее сохранение при снижении популяции микроорганизмов. Проведенные исследования позволили отобрать наиболее перспективные штаммы для их последующего изучения в качестве компонентов биопрепарата. Результаты исследований показали, что из 56 штаммов почвенных бактерий, обладающих целлюлозной активностью, только у 4 штаммов отмечали достаточно высокий ее уровень и сохранение этих значений при изменении начального бактериального титра.

Заключение

Изучена целлюлозолитическая активность 56 штаммов бактерий, выделенных из почвы. Отмечено, что снижение начальной концентрации не всегда приводило к снижению целлюлозолитической активности, а в отдельных случаях -наоборот приводило к ее возрастанию. При этом 15 исследованных штаммов проявляли целлюлозолитическую активность слабо, о чем свидетельствовали не значительные 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 обладающие наибольшим уровнем целлюлозолитической активности. Вторая часть проводимых исследований позволила отобрать из перечисленных штаммы П5.1, П7.3, П17.41 и П45.11 в качестве бактерий, наилучшим образом сохраняющих целлюлозолитическую активность при изменении начального бактериального титра

Литература

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. Vol.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. Vol.7 P.755.
3. Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges // J Sci Ind Res. 2005. Vol.64. P.832–844.
4. Chen H., Li X.-L., Ljungdahl L.G. 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. // J Bacteriol. 1997. Vol.179. P.6028–6034.
5. Malherbe S., Cloete T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications // Rev Environ Sci Biotechnol. 2002. Vol. 1. P.105–114.
6. Chidthaisong A., Conrad R. Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. // FEMS Microbiol Ecol. 2000. Vol. 31. P.87–94.
7. Maki M. L. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers // International journal of biochemistry and molecular biology. 2011. Vol.2(2). P.146-154.
8. Maki M., Leung K. T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass // Int J Biol Sci. 2009. Vol. 5. P.500–516.

9. Screening for cellulose and hemicellulose degrading enzymes from the fungal genus *Ulocladium* / M. Pedersen, M. Hollensted, L. Lange, et al. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2009. Vol. 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, et al. // *Int Microbiol.* 2002. Vol. 5. P.53–63.
11. Doi R. H. Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome and noncellulosome producers // *Ann NY Acad Sci.* 2008. Vol.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* // *FD-1. PLOS One.* 2009. Vol.4 (8). P. 256-261
13. Isolation of cellulolytic bacteria from cultivatedsoil samples / Maiorov P., Lyashenko E., Feoktistova N., Suldina E., Atamanova E. // *E3S Web of Conferences.* 2023. Vol. 411, P.02065
14. Dashtban M. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison // *Critical reviews in biotechnology.* 2010. P.1-8.
15. Teather R. M., Wood P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument // *Applied and environmental microbiology.* 1982. Vol. 43. No.4. P. 777-780.

References

1. Inhibition of nodulation and nitrogen nutrition of leguminouscrops by selected heavy metals / S.A. Haddad, M.A. Tabatabai, A.A. Abdel-Moneim, T.E. Loynachan // *Air Soil Water Res.* 2015. Vol.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. Vol.7 P.755.
3. Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Pandey A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges // *J Sci Ind Res.* 2005. Vol.64. P.832–844.
4. Chen H., Li X.-L., Ljungdahl L.G. 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. // *J Bacteriol.* 1997. Vol.179. P.6028–6034.
5. Malherbe S., Cloete T.E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications // *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2002. Vol.1. P.105–114.
6. Chidthaisong A., Conrad R. Pattern of non-methanogenic and methanogenic degradation of cellulose in anoxic rice field soil. // *FEMS Microbiol Ecol.* 2000. Vol. 31. P.87–94.
7. Maki M.L. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers // *International journal of biochemistry and molecular biology.* 2011. Vol.2(2). P.146-154.
8. Maki M., Leung K.T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass // *Int J Biol Sci.* 2009. Vol.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. Vol. 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. Vol. 5. P.53–63.
11. Doi R.H. Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome and noncellulosome producers // *Ann NY Acad Sci.* 2008. Vol.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* // *FD-1. PLOS One.* 2009. Vol.4(8). P. 256-261
13. Isolation of cellulolytic bacteria from cultivatedsoil samples / Maiorov P., Lyashenko E., Feoktistova N., Suldina E., Atamanova E. // *E3S Web of Conferences.* 2023. Vol.411, P.02065
14. Dashtban M. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison // *Critical reviews in biotechnology.* 2010. P.1-8.
15. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument // *Applied and environmental microbiology.* 1982. Vol. 43. No.4. P. 777-780.