

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *C. CELLULANS* ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Киргизбеков М.А., Насридинов М.Ш. студенты факультета
ветеринарной медицины и биотехнологии

Научный руководитель – к.б.н., доцент Майоров П.С.
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактерии, целлюлоза, *C. cellulans*, растения, разложение

В статье представлены результаты выделения бактерий C. cellulans из объектов окружающей среды. Результаты исследований показали, что коллекционный штамм максимально соответствовал по своим биологическим свойствам литературным данным. Из 14 отобранных для данного этапа работы штаммов максимальное соответствие по своим свойства бактериям C. cellulans проявляли 6 штаммов. Данные штаммы использовали для дальнейших экспериментов, посвященных определению целлюлозолитической активности.

Введение

Целлюлоза является основным компонентом растительной биомассы. Это распространенный дешевый биополимер и возобновляемый источник энергии. Ее полезность в качестве питательного вещества зависит от гидролиза до глюкозы, основного строительного элемента. Целлюлоза может быть гидролизована целлюлазами, группой ферментов, которые, действуя совместно, гидролизуют целлюлозу до более мелких полезных соединений, таких как целлиолигосахариды, целлобиоза и глюкоза. Целлюлазы обычно вырабатываются целлюлолитическими бактериями, которые свободно обитают в окружающей среде или ассоциированы с кишечным трактом травоядных животных, таких как термиты, рыбы и жвачные животные [1-4, 7].

Было проведено большое количество исследований с целью разработки эффективных способов переработки биомассы в продукты с высокой добавленной стоимостью. Биологическая обработка считается перспективным подходом к утилизации целлюлозных отходов, поскольку большинство выделенных микробных ферментов часто могут катализировать гидролитические реакции в окружающей среде [5-6, 8, 10].

В связи с этой целью исследования являлось проведение выделения бактерий, имеющих целлюлозоразрушающие свойства.

В качестве целевого объекта наших исследований были использованы образцы почвы и растительные остатки.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования выступали 24 образца почвы, отобранные на территории Ульяновской области из различных типов почвы. Отбор образцов проводился из характерных для бактерий *C. cellulans* типов почвы (меловая почва), а также мест, где было отмечено разложение растительных остатков.

Штаммы микроорганизмов

Для целей настоящей работы были использованы 1 коллекционный штамм бактерий *C. cellulans* Ac-1025, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (приложение 1) и 6 штаммов, выделенные из образцов почвы. Всего в работе было использовано 72 полевых культуры микроорганизмов.

Для выделения и культивирования микроорганизмов в работе были использованы питательные среды следующего состава:

Среда LB (г/л дистиллированной воды): 10 г триптона; 5,0 г дрожжевого экстракта; 10,0 г NaCl.

Базальная среда (г/л дистиллированной воды): KNO₃ - 2,5 г; K₂HPO₄ - 1,0 г; CaCl₂ - 0,1 г; MgSO₄ x 7H₂O - 0,3 г; NaCl - 0,1 г; FeCl₃ - 0,01 г, pH 7,0–7,2).

Среда Гетчинсона (г/л дистиллированной воды): NaNO₃ - 2,5 г; KH₂PO₄ - 1,0 г; MgSO₄ x 7H₂O - 0,3 г; NaCl - 0,1 г; CaCl₂ - 0,1 г; FeCl₃ - 0,01 г; pH среды доводят до 7,2 добавлением 20%-ного раствора Na₂CO₃.

СМС среда (г/л дистиллированной воды): пептон – 10,0 г; КМЦ – 10,0 г; KH_2PO_4 – 2,0 г; агар-агар – 10,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,5 г; желатин – 2,0 г.

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. Термостат (ТСО-1/80) ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»; Термометр; Ультрафиолетовая лампа марки «Phillips» с длиной волны 253 нм; Спиртовка; Петля пастеровская; Плитка электрическая; Лабораторная стерильная посуда; Дистиллированная вода; Лабораторные весы; Автоклав (ГК-100-3); Дистиллятор (Liston); генцианвиолет 548-62-9 (ЗАО «Вектон», РФ).

Выделение почвенных микроорганизмов проводили путем суспендирования навески исследуемого образца массой 10 г в 100 мл физ.раствора. После внесения почвы в физ.раствор полученную суспензию активно перемешивали в течение 2 минут и давали отстояться в течение 2-3 часов. Затем из полученной суспензии отбирали надсадок в объеме 5 мл и делали ряд последовательных разведений 1:10 до получения 1000-кратного разведения. Далее проводили посев полученных разведений на питательные среды и инкубировали посеvy в условиях термостата при температуре 28 °С в течение 48 часов.

Результаты исследований

Первый этап исследований был посвящен выделению бактерий *S. cellulans* из отобранных образцов почвы. Для этого в соответствии с представленной ранее методикой образцы почвы суспендировали и проводили высев разведений на питательные среды Гетчинсона, базальную и СМС агар.

Оценку роста колоний микроорганизмов на обозначенных питательных средах проводили ежедневно. На первые сутки наблюдался рост небольшого количества мелких колоний, отличающихся друг от друга по морфологии. На вторые сутки культивирования образцов почвы отмечали рост большого количества разнообразных колоний бактерий и грибов. Для оценки целлюлозолитической активности на поверхность питательных сред наносили 8-10 капель стерильного раствора Люголя после чего

отмечали те колонии, которые обладали ферментативной активностью, что проявлялось в виде зон просветления вокруг них (рис. 1).

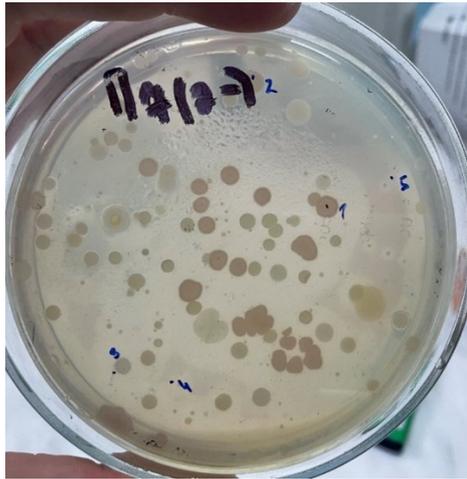


Рис. 1. Рост колоний микроорганизмов на среде Гетчинсона через 48 часов инкубирования

Колонии, обладающие целлюлозолитической активностью отбирали в стерильный питательный бульон для дальнейшего культивирования и изучения. Всего на данном этапе работы был отмечен рост из исследуемых образцов почвы 72 колоний, обладающих целлюлозолитической активностью и морфологически похожих на бактерии вида *C. cellulans*.

Далее была проведена первичная идентификация целевых микроорганизмов исходя из характерного для вида *C. cellulans* роста колоний и последующей окраски бактерий по Граму. Для этого был произведен высев на используемые ранее среды коллекционного штамма бактерий Ас-1025 и проведено визуальное сравнение характера роста данной бактерии с выделенными штаммами.



Рис. 2. Рост колоний штамма П2.2 на среде Геггинсона

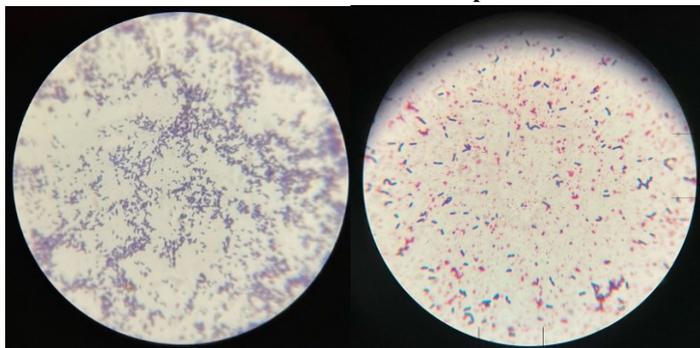


Рис. 3. Сравнительный анализ клеток выделенных штаммов с коллекционным штаммом (слева штамм П1.3, справа штамм П3.1)

Затем проведена окраска исследуемых бактерий по Граму и сравнение с коллекционным штаммом (рис. 3). Полученные результаты позволили из 72 выделенных штаммов с целлюлозолитической активностью отобрать для дальнейших исследований 14 культур бактерий, наиболее похожих на типовой штамм. Все 14 отобранных штаммов представляли собой грамположительные короткие не имеющие споруляции клетки длиной около 1-3 мкм.

Далее было проведено изучение биологических свойств отобранных штаммов бактерий для определения их принадлежности к

виду *C. cellulans*. Биологические свойства для изучения подбирали, основываясь на литературных данных.

Основываясь на полученных данных, можно отметить, что ферментативная активность изучаемых штаммов бактерий в большинстве случаев проявлялись лишь на 2-3 сутки, в отдельных случаях реакция протекала слабо, что проявлялось в слабом изменении цвета питательной среды.

Все изученные штаммы бактерий проявляли ферментативную активность в отношении глюкозы. В отношении сахарозы, ксилозы и маннозы активность отсутствовала у 3-х штаммов, манниты и мальтозы – по 2 штамма бактерий. Арабинозу ферментировали 11 изученных штаммов, сорбит и дульцит - только по 2 штамма. По отношению к лактозе и инозиту в соответствии с литературными данными бактерии *C. cellulans* проявляют вариабельность. Полученные результаты показали, что лактозу ферментировали только 2 штамма. По инозиту результаты разделили исследуемые штаммы пополам, 7 штаммов проявляла ферментативную активность.

В таблице 1 представлены обобщенные данные в сравнение с используемым в работе коллекционным штаммом.

Полученные результаты показали, что коллекционный штамм максимально соответствовал по своим биологическим свойствам литературным данным. Из 14 отобранных для данного этапа работы штаммов максимальное соответствие по своим свойствам бактериям *C. cellulans* проявляли 6 штаммов: ПЗ.1, П7.1, П11.1, П15.4, П18.5, П21.2. дальнейшие эксперименты, посвященные определению целлюлозолитической активности было принято решение проводить именно с данными штаммами бактерий.

источники и компосты, продолжались в течение многих лет. Однако в большинстве исследований основное внимание уделялось грибам, а не бактериям как источнику выработки целлюлазы. Итак, основной целью данного исследования было выделение и идентификация видов бактерий, способных эффективно гидролизовать соединения целлюлозы и действовать в качестве усилителя биодegradации этих соединений целлюлозы.

Проведено выделение целлюлозоразрушающих бактерий из объектов внешней среды. Первичный отбор бактерий для дальнейших исследований проводили на основе морфологических и культуральных свойств бактерий. Всего было выделено 72 штамма бактерий, обладавших целлюлозолитической активностью, из которых для дальнейших исследований были отобраны 14 культур, наиболее соответствующих виду *Cellulosimicrobium cellulans*. Все 14 отобранных штаммов представляли собой грамположительные короткие не имеющие спорulating клетки длиной около 1-3 мкм.

Сравнительный анализ полученных результатов был проведен с использованием коллекционного штамма и литературных данных. Полученные результаты показали, что коллекционный штамм максимально соответствовал по своим биологическим свойствам литературным данным. Из 14 отобранных для данного этапа работы штаммов максимальное соответствие по своим свойствам бактериям *C. cellulans* проявляли 6 штаммов. Данные штаммы использовали для дальнейших экспериментов, посвященных определению целлюлозолитической активности.

Библиографический список:

1. Klis FM: Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*. 1994, 10: 851-869. 10.1002/yea.320100702.
2. Fleet GH: Cell walls. *The Yeasts*. Edited by: Rose AH, Harrison JS. 1991, London, Academic Press, 4: 199-277.
3. Bielecki S, Galas E: Microbial β -glucanases different from cellulases. *Crit Rev Biotechnol*. 1991, 10: 275-304.
4. Kollár R, Reinhold BB, Petáková E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E: Architecture of the yeast cell

wall. β (1 \rightarrow 6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1 \rightarrow 3)glucan, and chitin. *J Biol Chem.* 1997, 272: 17762-17775. 10.1074/jbc.272.28.17762.

5. Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke P, Klis FM: Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiol.* 1996, 6: 337-345.

6. Shen S-H, Bastien L, Nguyen T, Fung M, Slilaty SN: Synthesis and secretion of hepatitis B middle surface antigen by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Gene.* 1989, 84: 303-309. 10.1016/0378-1119(89)90504-0.

7. Asenjo JA, Ventom AM, Huang R-B, Andrews BA: Selective release of recombinant protein particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Bio/Technology.* 1993, 11: 214-217. 10.1038/nbt0293-214.

8. Borriss R, Krah M, Brumer H, Kerzhner MA, Ivanen DR, Eneyskaya EV, Elyakova LA, Shishlyannikov SM, Shabalin KA, Neustroev KN: Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucooligosaccharides – new substrates for β -1,3-1,4-D-glucanase. *Carbohydr Res.* 2003, 338: 1455-1467. 10.1016/S0008-6215(03)00199-X.

9. Buchowiecka A, Bielecki S: Specificity of endo- β -1,3-glucanase G A from *Cellulomonas cellulans* towards structurally diversified acceptor molecules in transglycosylation reaction. *Biocatal Biotransform.* 2002, 20: 95-100. 10.1080/10242420290018078.

10. Buchowiecka A, Bielecki S: Determination of the regioselectivity of D-glucal glucosylation by endo- β -1,3-glucanase G A from *Cellulomonas cellulans* using CI MS. *Biocatal Biotransform.* 2003, 21: 1-5. 10.1080/1024242031000076206.

11. Doi K, Doi A, Ozaki T, Fukui T: Further studies on the heterogeneity of the lytic activity for isolated yeast cell walls of the components of an *Arthrobacter* glucanase system: properties of the two components of a β -(1 \rightarrow 3)-glucanase. *Agric Biol Chem.* 1976, 40: 1355-1362.

12. Vrsanská M, Biely P, Krátký Z: Enzymes of the yeast lytic system produced by *Arthrobacter* GJM-1 bacterium and their role in the lysis of yeast cell walls. *Z Allg Mikrobiol.* 1977, 17: 465-480.

13. Obata T, Fujioka S, Hara S, Namba Y: The synergistic effects among β -(1 \rightarrow 3)-glucanases from *Oerskovia* sp CK on lysis of viable yeast cells. *Agric Biol Chem.* 1977, 41: 671-677.

14. Jeffries TW, Macmillan JD: Action patterns fo (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanases from *Oerskovia xanthineolytica* on laminarin, lichenan and yeast glucan. *Carbohydr Res.* 1981, 95: 87-100. 10.1016/S0008-6215(00)85298-2.

15. Scott JH, Schekman R: Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J Bacteriol.* 1980, 142: 414-423.

SOLATION OF C. CELLULANS BACTERIA FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS

**Kirghizbekov M.A., Nasridinov M.Sh.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU**

Keywords: bacteria, cellulose, *C. cellulans*, plants, decomposition

The article presents the results of isolation of C. cellulans bacteria from environmental objects. The research results showed that the collection strain corresponded to the literature data as much as possible in terms of its biological properties. Of the 14 strains selected for this stage of work, 6 strains showed maximum compliance in their properties with C. cellulans bacteria. These strains were used for further experiments devoted to the determination of cellulolytic activity.