

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ *C. CELLULANS*

**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. Проведенные исследования показали, что 3 штамма бактерий показали отсутствие снижения целлюлозолитической активности при уровнях концентрации бактериальных клеток 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. При дальнейшем снижении наблюдалось резкое снижение ферментативной активности. У штаммов П7.1 и П21.2 при концентрации 10^5 КОЕ/мл ферментативная активность проявлялась только в непосредственной близости от колоний бактерий.*

Введение

Проводится большое количество исследований с целью разработки эффективных способов переработки биомассы в продукты с высокой добавленной стоимостью. Однако неустойчивый характер лигноцеллюлозной биомассы представляет собой серьезное препятствие для переработки и использования целлюлозной биомассы. Хотя для эффективного гидролиза сложных целлюлозных полимеров были разработаны различные физические и химические методы расщепления целлюлозосодержащих веществ, физико-химические методы обработки часто требуют жестких и экстремальных условий. Таким образом, биологическая обработка считается перспективным подходом к утилизации целлюлозных отходов, поскольку большинство выделенных микробных ферментов часто могут катализировать гидролитические реакции в окружающей среде [1-7, 11].

В связи с этим целью исследования являлось проведение определения целлюлозолитических свойств бактерий *C. cellulans*.

Материалы и методы

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.

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; KH₂PO₄ – 2,0 г; агар-агар – 10,0 г; MgSO₄ x 7H₂O - 0,3 г; (NH₄)₂SO₄ – 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).

Определение целлюлозолитической активности выделенных штаммов проводили путем выращивания разведений бактериальных культур на плотной питательной среде, содержащей источник целлюлозы, с последующей детекцией ферментативной активности добавлением к среде раствора Люголя или красителя Конго ред.

Уровень целлюлозолитической активности оценивали по размеру зон просветления вокруг выросших колоний бактерий.

Также для оценки целлюлозолитической активности культивировали исследуемые культуры бактерий в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл стерильной питательной среды. Для оценки ферментативной активности в колбу погружали диск фильтровальной бумаги с известной массой. Посевы культивировали в условиях термостата при температуре 28 °С в течение 7 суток. Уровень целлюлазной активности исследуемых штаммов бактерий оценивали по состоянию дисков из фильтровальной бумаги, степени их деструкции и изменению веса. Для оценки изменения веса диски фильтровальной бумаги предварительно высушивали в условиях сухожарового шкафа (180 °С) в течение 2 часов.

Результаты исследований

Для изучения целлюлозолитической активности отобранных штаммов бактерий было проведено культивирование бактерий на плотных питательных средах, содержащих 1% микрокристаллической целлюлозы. Культивирование посевов проводили в течение 4 суток, после чего проводили оценку целлюлозолитической активности бактерий. Для выявления зон ферментативной активности на поверхность питательной среды наносили краситель конго ред и раствор Люголя, которые вступают в реакцию с целлюлозой и окрашивают питательную среду в соответствующий цвет. После этого измеряли размер зон просветления вокруг выросших колоний, по которой судили о ферментативной активности конкретного штамма (рис. 1).

У отдельных штаммов отмечалась градация уровней целлюлозолитической активности, что проявлялось наличием не одного, но нескольких прозрачных колец вокруг выросшей колонии.

Далее тот же эксперимент был проведен с детекцией результата путем внесения на поверхность среды раствора Люголя (рис.2). Обобщенные результаты измерения зон просветления представлены в таблице 1.

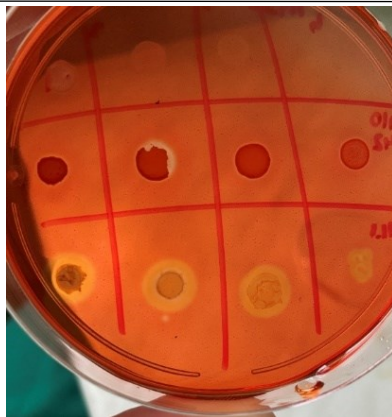


Рис. 1. Целлюлозолитическая активность некоторых выделенных штаммов с использованием красителя конго ред (нижний ряд: ПЗ.1, П11.1, П21.2, П18.5)

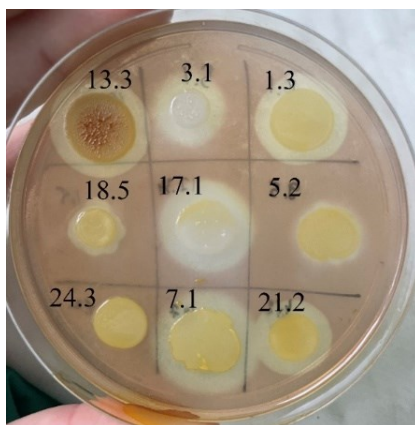


Рис. 2. Целлюлозолитическая активность некоторых выделенных штаммов после нанесения на питательную среду раствора Люголя (штаммы: ПЗ.1, П7.1, П18.5, П21.2)

В связи с использованием отличных друг от друга базовых питательных сред размер выросших колоний у одних и тех же штаммов отличались, но при этом уровень целлюлозолитической активности отличался не значительно.

Таблица 1. Размер зон целлюлозолитической активности выделенных штаммов бактерий

Название штамма	Размер зоны просветления при использовании красителя Конго ред, мм	Размер зоны просветления при использовании раствора люголя, мм
ПЗ.1	1,5	3
П11.1	2	4,1
П18.5	0,5	0,7
П7.1	3	4
П15.4	1,2	1,4
П21.2	4	3,7
Ас-1025	3	3,6

Полученные результаты показали, что размер зон целлюлозолитической активности исследуемых штаммов бактерий на плотной питательной среде с содержанием микрокристаллической целлюлозы находился в пределах от 0,5 мм до 4,1 мм. Было принято решение разделить исследуемые бактерии на 2 группы по уровню целлюлозолитической активности. Отметим, что штамм П11.1 можно было отнести к обоим группам, поскольку в данном случае наблюдалось наибольшее расхождение результатов при использовании различных вариантов определения уровня целлюлазной активности.

- 1 группа – зоны ферментативной активности до 3 мм. В данную группу были включены штаммы ПЗ.1, П11.1, П15.4 и П18.5. Включенные в данную группу штаммы рассматривали в дальнейшем как малопригодные для целей создания на их основе биопрепарата.

- 2 группа – зоны ферментативной активности от 3 до 4,1 мм. В данную группу были отнесены оставшиеся штаммы П7.1, П21.2 и Ас-1025. Бактерии данной группы рассматривали как наиболее перспективные в промышленном плане. Однако сравнивая результаты, полученные по используемым в работе штаммам бактерий, с результатами схожих экспериментов, но с использованием других видов бактерий, можно сделать вывод, что бактерии вида *C. cellulans* обладают далеко не самым высоким уровнем целлюлозолитической активности.

В дальнейшем был проведен эксперимент, направленный на изучение скорости проявления целлюлозолитических свойств исследуемыми бактериям в течение времени. Для этого каждый из исследуемых штаммов культивировали в течение 5 суток на

питательной среде, содержащей карбоксиметилцеллюлозу. Ежедневно определяли уровень ферментативной активности на спектрофотометре с использованием динитросалициловой кислоты [12]. На рисунке 3 приведены результаты проведенного эксперимента по второй группе бактерий.

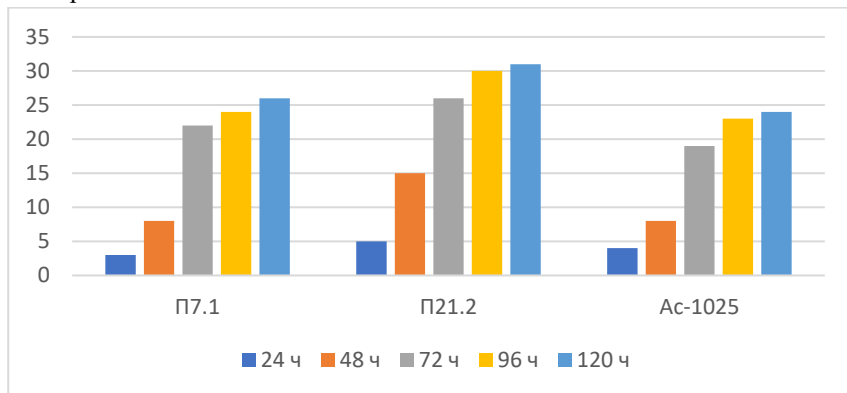


Рис. 3. Уровень КМЦазной активности исследуемых бактерий в течение времени

Как видно из представленного графика наибольшего роста КМЦазной активности удавалось достичь на 3 сутки эксперимента. После чего активность несколько снижалась. Наилучшие результаты были получены по штамму П21.2. Оставшиеся 2 штамма проявляли схожую динамику изменения КМЦазной активности. В отношении других 4 штаммов были проведены такие же исследования, результатом которых стало схожее изменение уровня ферментативной активности во времени, однако общий уровень находился значительно ниже представленных на рисунке штаммов.

На заключительном этапе было проведено изучение влияния концентрации бактериальных клеток на уровень их целлюлозолитической активности. Для этого суспензии бактериальных штаммов с различной концентраций наносили в объеме 0,1 мл на поверхность плотной питательной среды, содержащей 1% микрокристаллической целлюлозы. Культивирование посевов проводили в течение 24 часов, после чего оценивали полученные

результаты путем измерения зон ферментативной активности вокруг выросших колоний бактерий (рис.4).

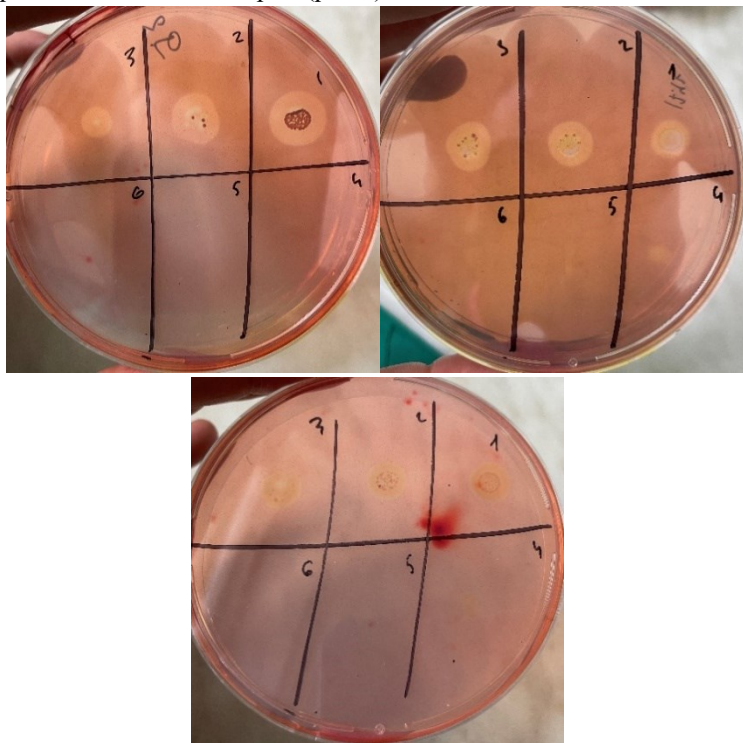


Рис. 4. Проявление ферментативной активности при различной концентрации бактериальных клеток (слева-направо штаммы П7.1, Ас-1025, П21.2)

При использовании всех 3-х штаммов из второй группы было отмечено отсутствие снижения целлюлозолитической активности при уровнях концентрации бактериальных клеток 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. При дальнейшем снижении наблюдалось резкое снижение ферментативной активности. В случае со штаммами П7.1 и П21.2 при концентрации 10^5 КОЕ/мл ферментативная активность проявлялась только в непосредственной близости от колоний бактерий. Штамм Ас-1025 показал схожее снижение ферментативной активности при снижении концентрации бактериальных клеток до 10^4 КОЕ/мл.

Таким образом по результатам проведенных экспериментов было отобрано 3 штамма бактерий, которые в дальнейшем были использованы для конструирования биопрепарата и оценки его целлюлозолитической активности.

Заключение

Эксперименты по выделению и характеристике активных микроорганизмов, продуцирующих целлюлазу, из различных источников, таких как почва, органические вещества, разложившиеся растительные материалы, фекалии жвачных животных, горячие 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 биodeградации этих соединений целлюлозы.

Изучение целлюлозолитической активности выделенных штаммов бактерий позволило разделить их на 2 группы. При исследовании всех 3-х штаммов из второй группы было отмечено отсутствие снижения целлюлозолитической активности при уровнях концентрации бактериальных клеток 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. При дальнейшем снижении наблюдалось резкое снижение ферментативной активности. В случае со штаммами П7.1 и П21.2 при концентрации 10^5 КОЕ/мл ферментативная активность проявлялась только в непосредственной близости от колоний бактерий. Штамм Ас-1025 показал схожее снижение ферментативной активности при снижении концентрации бактериальных клеток до 10^4 КОЕ/мл. Таким образом по результатам проведенных экспериментов было отобрано 3 штамма бактерий, которые в дальнейшем были использованы для конструирования биопрепарата и оценки его целлюлозолитической активности.

Таким образом удалось установить целлюлозоразрушающую способность бактерий *Cellulosimicrobium cellulans*. Данные микроорганизмы в перспективе могут быть использованы для конструирования комбинированного биопрепарата, направленного на деструкцию целлюлозосодержащего сырья. При этом требуются дальнейшие эксперименты, направленные на сравнение эффективности

действия выделенных бактерий с другими видами микроорганизмов, обладающих способностью к деструкции целлюлозы.

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 form 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, Krátky 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.

DETERMINATION OF CELLULOLYTIC PROPERTIES

C. CELLULANS

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 conducted studies showed that 3 bacterial strains showed no decrease in cellulolytic activity at bacterial cell concentration levels of 10^6 - 10^8 CFU/ml. With a further decrease, a sharp decrease in enzymatic activity was observed. In strains P7.1 and P21.2 at a concentration of 10^5 CFU/ml, enzymatic activity was manifested only in the immediate vicinity of bacterial colonies.