

ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ИХ РОЛЬ В СНИЖЕНИИ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ЭКОСИСТЕМУ

К.Н. Шмидт¹, Г.Г. Худайгулов²

¹ Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа

² Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством АН РБ, г. Уфа

Одной из важнейших задач биотехнологии в настоящее время является микробиологическая конверсия возобновляемых ресурсов биосферы, в том числе целлюлозы. Являясь по своему происхождению полисахаридом природного происхождения, целлюлоза, тем не менее, может нести определенную угрозу с экологической точки зрения, так как переработанные остатки стерни и леса способствуют размножению фитопатогенов. Производимое на полях сжигание стерни, принятое как распространенное явление в сельском хозяйстве, дает негативные последствия, а именно уничтожение полезных микроорганизмов почвы, снижение ее плодородия, истощение количества органического углерода и азота. Сжигание стерни на полях несет за собой большой экологический вред окружающей среде, особенно в условиях экстремально жаркого лета. В связи с вышесказанным перед учеными возникает задача поиска штаммов микроорганизмов с более эффективным биосинтезом целлюлаз. Из почв и ризосферы здоровых растений злаковых культур было выделено 40 изолятов целлюлолитических бактерий, из которых 5 штаммов показали высокие результаты по всем проведенным тестам, что делает выбранные для дальнейшего исследования микроорганизмы с повышенным синтезом целлюлаз эффективными для создания биопрепаратов, направленных на деградацию растительных остатков сельского хозяйства. В ходе проведения луночного метода определения целлюлолитических штаммов было выявлено, что 10 бактериальных изолятов проявляют повышенную целлюлолитическую активность. На основании результатов метода диффузии красителя для дальнейших опытов были выбраны следующие штаммы: Ш42.2, Ш52.3, Ш61'2, Ш102.1, Ш102.2. Представлены данные по количеству редуцирующих веществ в культуральной жидкости (концентрация глюкозы, г/л): Ш42.2 – 0,030; Ш52.3 – 0,029; Ш61'2 – 0,050; Ш102.1 – 0,031; Ш102.2 – 0,032. Согласно вискозиметрическому методу определения целлюлолитической активности наиболее сильное снижение вязкости наблюдается у изолятов Ш42.2, Ш52.3, Ш102.2. Было установлено, что исследуемые целлюлолитических штаммы не проявляют фитотоксичных свойств на проращивание семян пшеницы.

Ключевые слова: биоконверсия целлюлозы, целлюлолитические бактерии, целлюлолитическая активность, целлюлазы, скрининг бактерий, краситель конго-красный, диффузия красителя, почва, вязкость, редуцирующие сахара.

Введение

Высокая техногенная нагрузка на окружающую среду подразумевает не только увеличение количества ксенобиотиков, выбрасываемых в атмосферу, но и высокий уровень таких отходов, которые в норме присутствуют в экосистеме, а именно целлюлозы [1]. В последние годы накопление отходов целлюлозы все чаще рассматривается как экологическая проблема, вследствие чего остро встает вопрос реализации утилизации отходов растительного сырья [2].

Целлюлолитические микроорганизмы встречаются среди чрезвычайно разных таксономических групп, и могут быть найдены во всех биотах, где скапливается целлюлоз-

ные отходы. Как правило, штаммы-продуценты целлюлаз встречаются в смешанных популяциях, содержащих целлюлолитические и нецеллюлолитические виды, часто взаимодействующих синергетически, что приводит к полной деградации целлюлозы, которая в конечном счете превращается в углекислоту и воду в аэробных условиях и углекислоту, метан и воду в анаэробных [3].

Бактерии, расщепляющие целлюлозу, могут быть выделены из различных мест их обитания, таких как почва, разложившихся растительных материалов, компостов, рубце и фекалий жвачных животных. Целлюлолитические ферменты также были найдены в круглых червях, муравьях-древоточках, термитах, жуках-

короедах и других подобных им организмах, поедающих кору или опавшие листья [4].

Помимо вопроса утилизации целлюлолитических отходов, в последнее время возрос интерес к так называемым «нулевым» и «минимальным» технологиям в области сельского хозяйства, что подразумевает под собой минимальное использование техники и ресурсов и получение максимальной финансовой выгоды с единицы засеиваемой площади. Обработка стерни после сбора урожая пшеницы способна повысить не только питательную ценность почвы вследствие возврата веществ в почву, но и уменьшить количество фитопатогенов и расход химических средств, направленных на борьбу с ними [5].

В связи с этим научная и практическая значимость выделения и изучения новых штаммов целлюлозолитических бактерий, а также разработка биопрепаратов и технологий на их основе является актуальной.

Материалы и методы исследования

Штаммы бактерий, проявляющих целлюлолитическую активность, выделяли из образцов различных типов почв и древесины.

Для выделения целлюлолитических бактерий применяли метод посева взвеси почвы на поверхность синтетической питательной среды Гетчинсона (Гч) рН 7,2 с помещенной на ее поверхность стерильной фильтровальной бумаги [6]. Данная среда является селективной для штаммов, обладающих целлюлолитической активностью [7]. Состав среды Гч приведен в табл. 1.

Таблица 1
Состав синтетической питательной среды Гетчинсона

Компонент	г/л
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,3
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,6
$CaCl_2$	0,1
$NaCl$	0,1
$FeCl_3$	0,01
$NaNO_3$	2,5
Агар-агар	20,0

Метод предельных разведений

В колбы Эрленмейера объемом 250 мл вносили образцы почвы с расчетом 1 г на 100 мл стерильной воды. Взбалтывали на шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20 в течение 2 часов при 180 об/мин. Отстаивали 10-15 мин для осаждения твердых частиц.

После проведения последовательного разведения в 1000 раз, 100 мкл суспензии наносят на агаризованную чашку Петри с синтетической питательной средой Гч с помещенной на поверхность стерильной фильтровальной бумагой в качестве источника углерода. Засеянные чашки инкубировались в термостате при 28 °С в течение 10 дней [6].

Условия хранения изолятов бактерий

Для поддержания культур использовали субкультивирование (пересев каждые 3 недели) на среде Гетчинсона с КМЦ (Гч-КМЦ). Стерилизацию сред проводили в автоклаве ВК-75 при 1 ати, 30 мин. Посевы инкубировали при 30 °С в течение двух суток, а затем хранили их в течение месяца при температуре 4 °С [8].

Условия культивирования бактерий

Культуры выращивали при 35 °С и 140 об/мин на воздушно-термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20 в жидкой питательной среде Гетчинсона с КМЦ в качестве источника углерода в течение 72 часов [8].

Луночный метод определения целлюлолитических штаммов

Для выявления активных целлюлолитиков был выбран луночный метод определения [8], а также способность красителя конго-красный образовывать комплекс с целлюлозой [13]. В лунки (среда ГЧ-КМЦ) вносили по 100 мкл 2-суточной культуральной жидкости, инкубировали на протяжении 24 часов. После чего окрашивали среду 1 % конго-красным, выдерживали 15 минут и смывали 1 М раствором NaCl. Оценкой наличия целлюлолитической активности служила зона просветления вокруг лунок. Данный метод был выбран в качестве первичного скрининга. Для сравнения эффективности исследуемых бактериальных изолятов для обработки целлюлозосодержащих отходов использовали ускоритель компоста производства «Доктор Робик».

Метод диффузии красителя

Далее нужно было оценить активность выбранных штаммов. Был выбран метод диффузии красителя [10].

В данном методе применяется двухслойная среда: нижний слой представляет собой 1 % КМЦ в 2 % агаре; второй, верхний слой, - среда ГЧ-КМЦ с 1 % красителем конго-красным. Скорость диффузии красителя во второй, неокрашенный слой говорит об активности разрушения целлюлозы.

Было проведено два опыта: первый – с использованием культуральной жидкости, второй – с супернатантом культуральной жидкости. Супернатант отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418 R при 12000 об/мин в течение 10 минут.

Определение редуцирующих веществ в культуральной жидкости

Целлюлазную активность определяли калориметрическим методом, основанным на определении восстанавливающих сахаров (ВС), образующихся под действием целлюлолитического комплекса на субстрат – На-КМЦ. Для определения ВС использовали DNS-реагент [11].

Реакционная смесь содержала 10 мг субстрата в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,0) и 0,5 мл неочищенного фермента (супернатанта). Супернатант отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418 R при 12000 об/мин в течение 10 минут. Реакцию гидролиза проводили при 50°C в течение 30 минут. По истечении времени инкубирования реакция останавливалась добавлением 1,5 мл раствора ДНС и нагреванием пробирок в водяной бане в течение 10 минут (с точностью до секунд). Редуцирующие сахара определялись калориметрически при длине волны 540 нм. Калибровка выполнялась по глюкозе. За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на субстрат в условиях ферментативной реакции за минуту образуется 1 μ моль ВС в пересчете на глюкозный эквивалент.

Вискозиметрический метод определения целлюлолитической активности

Вследствие ферментативного гидролиза молекул целлюлозы вязкость раствора снижается [12]. Для оценки кинематической вязкости культуральной жидкости использовали стеклянный капиллярный вискозиметр Оствальда типа ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,09 мм [13].

Супернатант отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R при 5000 об/мин в течение 20 минут при комнатной температуре.

Определение фитотоксичности

Для определения фитотоксичности исследуемых штаммов проводили замачивание семян пшеницы (в количестве 20 семян на

штамм) в разбавленной в 10 раз культуральной жидкости в течение часа. Сравнение проводили с контролем (семена в контрольном варианте замачивали в стерильной водопроводной воде).

Предварительно семена поверхностно стерилизовали в целях полного подавления эпифитной микрофлоры семян, но сохранения жизнеспособного состояния зародышей семян: семена промывали сначала в водопроводной, затем в дистиллированной воде, выдерживали в течение 30 мин в 10 % растворе хлорамина, трехкратно промывали стерильной водопроводной водой.

Исследуемые штаммы бактерий культивировали 3-е суток на жидкой среде Гч-КМЦ на воздушно-термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20 при температуре 35 °C и 140 об/мин [14].

Стерильные семена пшеницы (сорт «Башкирская 24») замачивали в полученных суспензиях клеток бактерий в течение 1 часа и в условиях опыта *in vitro* выкладывали на увлажненную стерильную фильтровальную бумагу в стерильные чашки Петри. Семена выращивали в термолюмоностате при 25 °C в течение 7 суток [15].

Исследование роста выбранных изолятов на голодном агаре

Штаммы бактерий засеивали штрихом на поверхность голодного агара-агар, приготовленный на минеральной питательной среде или воде в условиях дефицита органических веществ с целью изучения роста на данной среде. Стерилизацию среды проводили в автоклаве ВК-75 при 1 ати, 30 мин. Посевы инкубировали при 30 °C в течение двух суток [14].

Изучение ферментативной активности

Гомогенизированная фильтровальная бумага в концентрации 5 г/л вносилась в среду Гч в качестве источника углерода и стерилизовалась в автоклаве ВК-75 при 1 ати, 30 мин. Штаммы бактерий засеивали штрихом на поверхность среды, посевы инкубировали при 30 °C [14] в течение 406 часов.

По истечении времени инкубирования для проявления зон просветления среду окрашивали 1 % конго-красным, выдерживали 15 минут и смывали 1 М раствором NaCl. Оценкой наличия целлюлозолитической активности служила зона просветления вокруг штриха [9].

Результаты и обсуждение**Скрининг целлюлолитических штаммов бактерий**

Высевом на синтетическую среду Гетчинсона с КМЦ (Гч-Кмц) было получено 40 изолятов. Однако рост на данной среде не является показателем способности микроорганизма к активной деградации целлюлозы [10].

Луночный метод определения целлюлолитических штаммов

3-х суточную культуральную жидкость полученных изолятов исследовали на выявление активных целлюлолитических штаммов. Оценкой наличия целлюлолитической активности служила зона просветления вокруг лунок. Диаметры наибольших зон просветления указаны в табл. 2.

В результате проведенного опыта было выявлено 10 изолятов, проявляющих повышенную целлюлолитическую активность.

Метод диффузии красителя

Метод диффузии красителя был применен для оценки активности выбранных штаммов. Скорость диффузии красителя во второй, неокрашенный слой говорит об активности разрушения целлюлозы. При оценке активности выбранных изолятов использовали 3-х суточную культуральную жидкость, а также неочищенный фермент (супернатант). Результаты эксперимента приведены на рис. 1, 2 – для опыта с культуральной жидкостью исследуемых бактерий, на рис. 3, 4 – для супернатантов.

На основе полученных данных для дальнейших опытов были выбраны следующие штаммы: Ш42.2, Ш52.3, Ш61'2, Ш102.1, Ш102.2.

Определение редуцирующих веществ в культуральной жидкости

Одним из важных показателей для сравнения эффективности целлюлолитических штаммов, предназначенных для биоконверсии

Таблица 2

Луночный метод определения целлюлолитических штаммов

Ш31.3	Ш32.3	Ш42.2 20 мм	Ш43.2	Контроль	Ш2'12	Ш41.2	Ш11.2	Ш22.2
Ш21.2	Ш44.2	Ш43.2'	Ш61'2 15 мм	Контроль	Ш41.2	Ш42.2' 22 мм	Ш33.3 20 мм	Ш9'22
Ш81.3	Ш81.3'	Ш83.3	Ш82.3	Контроль	Ш81'3	Ш81.3	Ш91.3	Ш91.3'
Ш5'21 21 мм	Ш5'11	Ш3'11	Ш7'31	Контроль	Ш32.1	Ш7'21	Ш7'11	Ш51.1
Ш52.1	Ш92.3	Ш2'22 10 мм	Ш62'2	Биопрепарат	Ш52.3 22 мм	Ш31.3	Ш102.1 25 мм	Ш102.2 24 мм

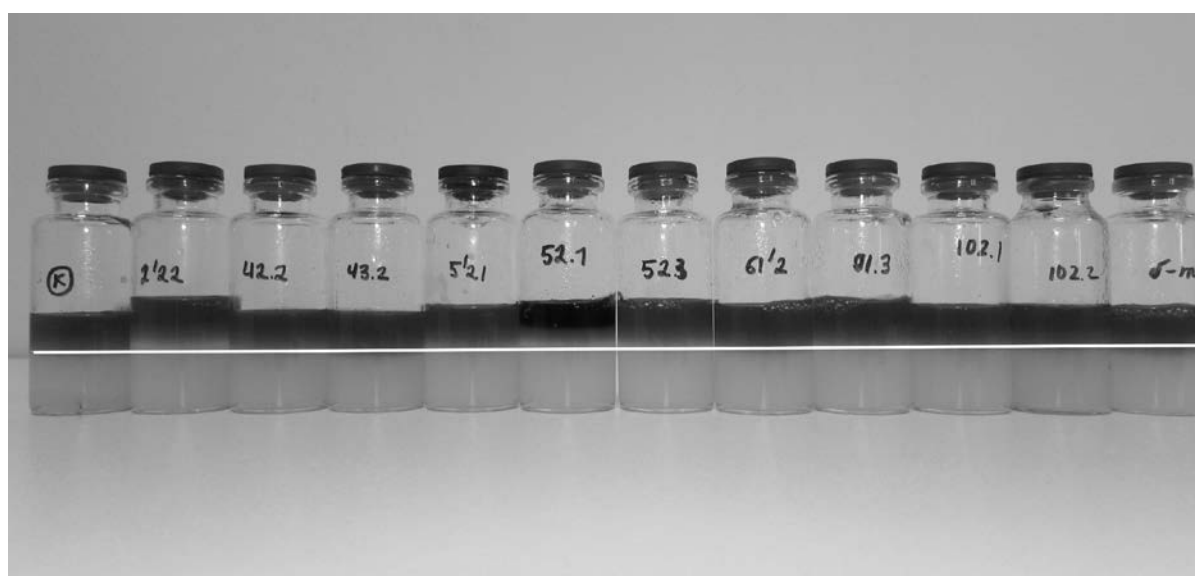


Рис. 1. 0 часов культивирования (опыт с КЖ)

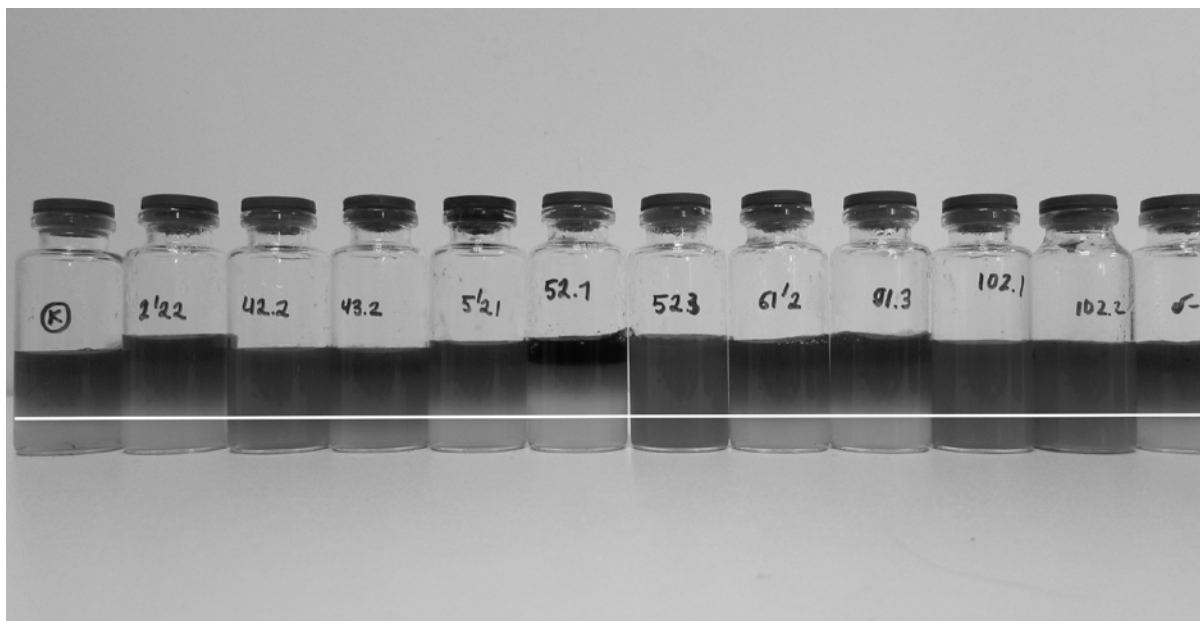


Рис. 2. 96 часов культивирования (опыт с КЖ)

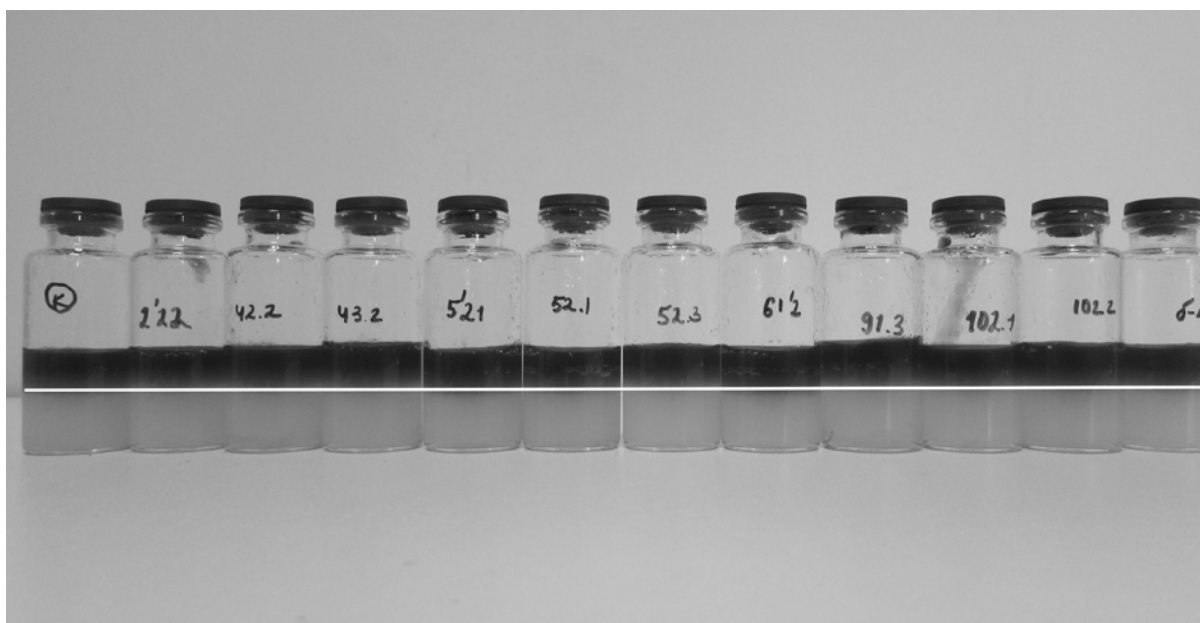


Рис. 3. 0 часов культивирования (опыт с супернатантом)

целлюлозы, служит их активность к своим специфическим субстратам: растворимых и нерастворимых полисахаридам, таким как, карбоксимелцеллюлоза (КМЦ), микрокристаллическая целлюлоза, ксилан, олигосахариды (целлобиозы).

В методе определения редуцирующих веществ в реакции с DNS-реагентом использовали 3-суточную культуральную жидкость исследуемых штаммов. За единицу активно-

сти принимали такое количество фермента, при действии которого на субстрат в условиях ферментативной реакции за минуту образуется 1 $\mu\text{моль}$ ВС в пересчете на глюкозный эквивалент. Результаты сведены в табл. 3.

В соответствии с полученными результатами мы предполагаем, что изолят Ш61'2 наиболее эффективно гидролизует используемый субстрат – Na-КМЦ.

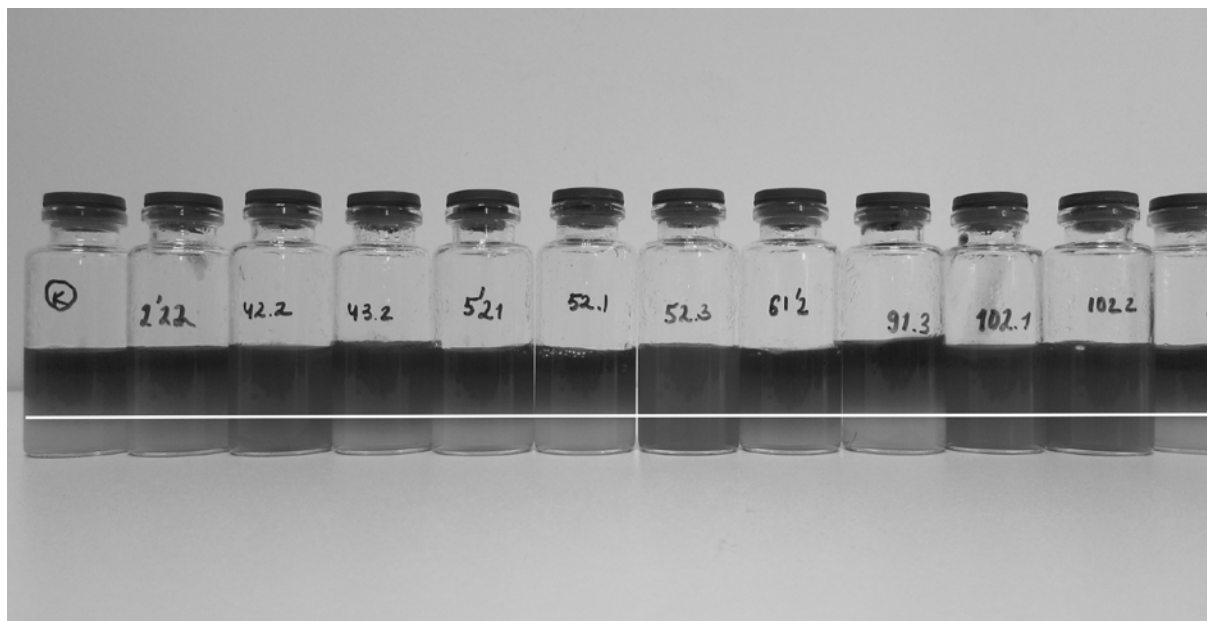


Рис. 4. 96 часов культивирования (опыт с супернатантом)

Таблица 3

Целлюлазная активность исследуемых штаммов

№	Концентрация глюкозы, г/л	Целлюлазная активность, усл. ед. (мкмоль/мин)
Биопрепарат	0,031	5,736
Ш42.2	0,030	5,550
Ш52.3	0,029	5,365
Ш61'2	0,050	9,251
Ш102.1	0,031	5,736
Ш102.2	0,032	5,921

Вискозиметрический метод определения целлюлолитической активности

Для косвенной оценки целлюлолитической активности исследуемых штаммов, основанной на убыли вязкости раствора карбоксиметилцеллюлозы, использовали стеклянный капиллярный вискозиметр Оствальда типа ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,09 мм. Культуры выращивали при 35°C и 140 об/мин на воздушно-термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20 в жидкой питательной среде ГЧ-КМЦ в течение 408 часов. Результаты приведены в табл. 4.

Вязкость раствора карбоксицеллюлозы снижается во всех случаях, наиболее сильное снижение наблюдается у изолятов Ш42.2, Ш52.3, Ш102.2.

Таблица 4

Кинематическая вязкость супернатанта культуральной жидкости исследуемых штаммов

№	Кинематическая вязкость, сСт
Биопрепарат	1,5064 ± 0,075
Ш42.2	1,1200 ± 0,056
Ш52.3	1,2829 ± 0,064
Ш61'2	1,3236 ± 0,066
Ш102.1	1,3539 ± 0,068
Ш102.2	1,2956 ± 0,065
Стерильная среда ГЧ-КМЦ	2,0995 ± 0,105

Определение фитотоксичности

Для определения фитотоксичности исследуемых штаммов проводили замачивание семян пшеницы (в количестве 20 семян на штамм) в разбавленной в 10 раз культуральной жидкости в течение часа. Сравнение проводили с контролем (замачивание семян в дистиллированной воде).

Фитотоксичность оценивали, сравнивая процент всхожести семян, длину проростков и корней; данные указаны в табл. 5.

ния вокруг штриха посевов. Диаметры зон просветления приведены в табл. 7.

Исследуемые изоляты целлюлолитических бактерий показали различную способность гидролизовать субстрат – фильтровальную бумагу, внесенную в среду Гч. При оценке ферментативной активности необходимо учитывать факт неравномерного распределения измельченной фильтровальной бумаги в среде.

Таблица 5

Фитотоксичность исследуемых бактериальных изолятов

№	Количество проросших семян, шт.	Средняя длина проростков, см	Средняя длина корней, см	Всхожесть, %
Контроль	20	6,0	7,1	100
Биопрепарат	19	5,5	6,9	95
Ш42.2	20	6,0	7,5	100
Ш52.3	20	6,3	7,4	100
Ш61'2	20	6,1	7,1	100
Ш102.1	20	6,4	7,6	100
Ш 102.2	20	6,1	7,7	100

Нами не было выявлено негативного воздействия исследуемых образцов целлюлолитических изолятов на прорастание семян пшеницы.

Исследование роста выбранных изолятов на голодном агаре

Исследуемые изоляты целлюлолитических бактерий показали практически одинаковый характер роста на голодном агаре. Рост культур оценивался по пятибалльной системе: 1 балл (+) означал еле заметный рост культуры, 2 балла (++) – слабый рост, 3 балла (+++) – умеренный рост, 4 балла (++++) – хороший рост, 5 баллов (+++++) – обильный рост. Оценка роста исследуемых бактерий приведена в табл. 6.

Изучение ферментативной активности

Культуру целлюлолитических изолятов, термостатируемую при 30 °С в течение 406 часов на элективной среде Гч с гомогенизированной фильтровальной бумагой в качестве источника углерода с концентрацией 5 г/л исследовали на выявление ферментативной активности. Оценкой наличия целлюлолитической активности служила зона просветле-

Таблица 6

Оценка роста изолятов целлюлолитических бактерий на голодном агаре

№	Рост культуры
Биопрепарат	+
Ш42.2	++
Ш52.3	++
Ш61'2	+
Ш102.1	+
Ш102.2	+

Таблица 7

Диаметр зон просветления целлюлолитических штаммов на агаризованной среде Гч с измельченной фильтровальной бумагой

№	Диаметр зон просветления, мм
Биопрепарат	–
Ш42.2	6
Ш52.3	10
Ш61'2	6
Ш102.1	15
Ш102.2	15

Выводы

Из сорока бактериальных изолятов, выделенных из различных типов почвы и способных расти на агаризованной среде Гетчинсона с натрий-карбоксиметилцеллюлозой в качестве источника углерода, лишь некоторые бактерии показали целлюлолитическую активность в тесте с конго красным.

В результате проведения эксперимента, основанном на диффузии красителя, было обнаружено только пять бактерий, обладающих высокой целлюлазной активностью фермента. Выбранные для дальнейшего исследования бактериальные изоляты с повышенным биосинтезом целлюлаз показали положительные результаты по всем проведенным тестам, на основании чего можно сделать заключение, что полученные штаммы могут быть использованы при создании препаратов для деградации растительных остатков сельскохозяйственного производства.

Литература

1. Хаустов, А.П. Нормирование антропогенных воздействий и оценки природоёмкости территорий: учеб. пособие / П.Г. Хаустов, М.М. Редина. – М.: РУДН, 2008. – 282 с.
2. Маслак, Д.В. Активность целлюлолитического комплекса индуцированных мутантов *Bacillus subtilis* / Д.В. Маслак, И.Н. Феклистова, И.А. Гринева, Т.Л. Скакун, Л.Е. Садовская, Н.П. Максимова // Труды БГУ. – 2015, Т. 10. Ч. 1. – С. 82–89.
3. Krupa Mary Jacob, Ashitha George, Manjusha, Mythili Sathivelu and Sathivelu A, Isolation and Screening of Cellulose Degrading Microorganisms from the Gut of Composting Earthworms and Its Industrial Applications / Krupa Mary Jacob, Ashitha George, Manjusha, Mythili Sathivelu and Sathivelu A // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – P. 501–507.
4. Begun, P. The biological degradation of cellulose / P. Begun, J.P. Aubert // FEMS Microbiol Rev. – 1994. – V. 13. – P. 25–58.
5. Смирнова, И.Э. Целлюлолитические бактерии, перспективные для разработки биопрепаратов для защиты сахарной свеклы / И.Э. Смирнова, А.А. Мауи, Р.Ш. Галимбаева // Вестник КазНУ. Серия экологическая. – 2013. – № 2/2 (38). – С. 334–339.
6. Звягинцев, Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. – метод. пособие / Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
7. Аникеев, В.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В.В. Аникеев, К.А. Лукомская. – 2-е изд. – М.: Просвещение, 1983. – 127 с.
8. Jantje Ngangi, Jantje Pelealu, Joutje Warouw, Lusi Mandey. Isolation and activity of cellulolytic bacteria isolated from hindgun of *Odontotermes spa subteran termite* on Wasian (*Elmerelia celebica* L.) an Endemic Wood to North Sulawesi / Jantje Ngangi, Jantje Pelealu, Joutje Warouw, Lusi Mandey // International Journal of Science and Engineering Investigations. – 2013. – V. 2, Is. 22. – P. 8–16.
9. Teather, R.M. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen / R.M. Teather, P.J. Wood // Environmental Microbiology. – 1982. – V. 43. – P. 777–780.
10. Ponnambalam, A.S. Qualitative Display and Measurement of Enzyme Activity of Isolated Cellulolytic Bacteria / A.S. Ponnambalam, R.S. Deepthi, A.R. Ghosh // Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering. – 2011. – P. 33–37.
11. Muhammad Irfan, Asma Safdar, Quratulain Syed, Muhammad Nadeem. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity / Muhammad Irfan, Asma Safdar, Quratulain Syed, Muhammad Nadeem // Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]. – 2012. – P. 287–293.
12. Голязимова, О.В. Механическая активация ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы / О.В. Голязимова, А.А. Политов, О.И. Ломоносский // Химия растительного сырья. – 2009. – С. 59–63.
13. Алимова, Ф.К. Методы определения гидролаз почв и почвенных микроорганизмов: учеб.-метод. пособие / Ф.К. Алимова., Р. И. Тухбатова, Д. И. Тазетдинова. – Казань: Казанский университет, 2010. – 67 с.
14. Itthivet Tulyathan, Wanchai Assavalapsakul. Screening of the cellulolytic microorganisms from the Cassava-growing land area // The 26th Annual Meeting of the Thal Society for Biotechnology and International Conference. Chiang Rai, Thailand, 26–29 November 2014, pp. 266–270.
15. Асабина, Е.А. Исследование оптимальных условий культивирования бактерий рода *Pseudomonas* – продуцента биологически активных веществ: автореф. дис. канд. биол. наук / Е.А. Асабина. – Уфа: Научный центр РАН, 2009. – 100 с.

Шмидт Кристина Николаевна. Студент кафедры биохимии и технологии микробиологических производств, Уфимский государственный нефтяной технический университет (г. Уфа), schmidt.christina1@yandex.ru

Худайгулов Гайсар Гараевич. Кандидат биологических наук, заместитель начальника ГБУ республики Башкортостан «Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством АН РБ», bio.logos@yandex.com

Поступила в редакцию 27 августа 2016 г.

DOI: 10.14529/food160406

ISOLATION OF NEW CELLULOSE DESTRUCTION STRAINS, THEIR ROLE IN THE DECREASE OF ANTHROPOGENIC LOAD TO THE ECOSYSTEM

K.N. Shmidt¹, G.G. Khudaigulov²

¹ Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russian Federation

² Research Institute of Herbicides AS RB State-Financed Organization, Ufa, Russian Federation

Nowadays, one of the most important problems of biotechnology is microbiological conversion of renewable resources of the biosphere, including cellulose. Being polysaccharide of a natural origin, cellulose nevertheless can pose a certain threat from the ecological point of view, since unprocessed stubble and wood remains promote reproduction of plant pathogens. Stubble burning in the fields, accepted as the widespread phenomenon in agriculture, leads to negative and sometimes irreversible consequences, namely destruction of useful soil microorganisms, decrease of the soil fertility, exhaustion of organic carbon and nitrogen amount. Besides, stubble burning in the fields, especially in the conditions of extremely hot summer, results in significant ecological harm to the environment. Regarding the abovementioned, the scientists are facing the task to find microorganisms with more effective biosynthesis cellulases. There are more than 40 species of cellulolytic bacteria isolated from soils and rhizosphere of healthy cereal cultures, among which 5 strains have shown good results according to all carried-out tests. This makes microorganisms with the increased synthesis of cellulose, chosen for a further research, effective for creation of the biological preparations, directed to the degradation of vegetable waste of agriculture. With the clearing zone method of cellulolytic strains definition, it is revealed that 10 bacterial isolates show the increased cellulolytic activity. On the basis of gel-diffusion method results, the following strains are chosen for the further experiments: Sh42.2, Sh52.3, Sh612, Sh102.1, Sh102.2. Data on the amount of reducing substances in cultural liquid is submitted (concentration of glucose, g/l): Sh42.2 – 0,030; Sh52.3 – 0,029; Sh612 – 0,050; Sh102.1 – 0,031; Sh102.2 – 0,032. According to viscosity method of cellulolytic activity definition, the most significant decrease in viscosity is observed in Sh42.2, Sh52.3, Sh102.2 isolates. It is ascertained that the experimental cellulolytic strains don't show phytotoxic properties on germination of wheat seeds.

Keywords: isolation, cellulose bioconversion, cellulolytic bacteria, cellulolytic activity, cellulases, bacterial screening, congo red assay, gel diffusion assay, soil, viscosity, reducing sugars.

References

1. Khaustov A.P., Redina, M.M. *Normirovanie antropogennykh vozdeistviy I otsenki prirodoemkosti territoriy* [Rationing of anthropogenous influences and assessment of environmental capacity of territories]. Moscow, 2008. 282 p.

2. Maslak D.V., Feklistova I.N., Grineva I.A., Skakun T.L., Sadovskaya L.E., Maksimova N.P. [Aktivnost' tsellyuloliticheskogo kompleksa indutsirovannykh mutantov *Bacillus subtilis*]. *Trudy BGU* [Works of the BSU], 2015, vol. 10, pt. 1, pp. 82–89. (in Russ.)
3. Krupa Mary Jacob, Ashitha George, Manjusha, Mythili Sathiavelu and Sathiavelu A, Isolation and Screening of Cellulose Degrading Microorganisms from the Gut of Composting Earthworms and Its Industrial Applications / Krupa Mary Jacob, Ashitha George, Manjusha, Mythili Sathiavelu and Sathiavelu A. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2014, pp. 501–507.
4. Begun P., Aubert J.P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, V. 13, 1994, pp. 25–58. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x
5. Smirnova I.E., Maui A.A., Galimbaeva R.Sh. [Cellulolytic bacterias, perspective for development of biological products for protection of sugar beet]. *Vestnik KazNU* [Messenger of KazNU. Ecological series], 2013, , pp. 334–339. (in Russ.)
6. Zvyagintsev D.G. *Metody pochvennoy mikrobiologii i biokhimii* [Methods of soil microbiology and biochemistry]. Moscow, Moscow Gos. Univ. Publ., 1991. 304 p.
7. Anikeev V.V. *Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii* [The guide to a practical training to microbiology and biochemistry]. Moscow, Prosveshchenie Publ., 1983. 127 p.
8. Jantje Ngangi, Jantje Pelealu, Joutje Warouw, Lusi Mandey. Isolation and activity of cellulolytic bacteria isolated from hindgun of *Odontotermes* spa subteran termite on Wasian (*Elmerrelia celebica* L.) an Endemic Wood to North Sulawesi. *International Journal of Science and Engineering Investigations*, V. 2, Is. 22, 2013, pp. 8–16.
9. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Environmental Microbiology*, V. 43, 1982, pp. 777–780.
10. Ponnambalam A.S., Deepthi R.S, Ghosh A.R. Qualitative Display and Measurement of Enzyme Activity of Isolated Cellulolytic Bacteria. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, 2011, pp. 33–37.
11. Muhammad Irfan, Asma Safdar, Quratulain Syed, Muhammad Nadeem. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry – Turk J Biochem]*, 2012, pp. 287–293. DOI: 10.5505/tjb.2012.09709
12. Golyazimova, O.V., Politov, A.A., Lomonovskiy, O.I. [Mechanical activation of enzymatic hydrolysis of a lignocellulose]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of vegetable raw materials], 2009, pp. 59–63. (in Russ.)
13. Alimova F.K. *Metody opredeleniya gidrolaz pochv i pochvennykh mikroorganizmov* [Methods of definition soil's higrilase and soil microorganisms]. Kazan, Kazan University Publ., 2010. 67 p.
14. Itthivet Tulyathan, Wanchai Assavalapsakul. Screening of the cellulolytic microorganisms from the Cassava-growing land area. *The 26th Annual Meeting of the Thal Society for Biotechnology and International Conference*. Chiang Rai, Thailand, 26–29 November 2014, pp. 266–270.
15. Asabina Ye.A. *Issledovaniye optimal'nykh usloviy kul'tivirovaniya bakteriy roda Pseudomonas – produtsenta biologicheskii aktivnykh veshchestv* [Research of optimum conditions for cultivation of *Pseudomonas* bacteria as producer of biologically active agents]. Ufa, 2009, 100 p.

Kristina N. Shmidt. Student of Biochemistry and Technology of Microbiological Production Department, Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, schmidt.christinal@yandex.ru.

Gaisar G. Khudaigulov, Candidate of Biology, Deputy Chief of Research Institute of Herbicides AS RB State-Financed Organization, Ufa, bio.logos@yandex.com

Received 27 August 2016

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Шмидт, К.Н. Выделение новых штаммов-деструкторов целлюлозы, их роль в снижении антропогенной нагрузки на экосистему / К.Н. Шмидт, Г.Г. Худайгулов // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2016. – Т. 4, № 4. – С. 54–63. DOI: 10.14529/food160406

FOR CITATION

Shmidt K.N., Khudaigulov G.G. Isolation of New Cellulose Destruction Strains, their Role in the Decrease of Anthropogenic Load to the Ecosystem. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2016, vol. 4, no. 4, pp. 54–63. (in Russ.) DOI: 10.14529/food160406