

СТАТЬЯ

УДК 579.64

**ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОУДОБРЕНИЯ ПОД КОРМОБОБОВЫЕ КУЛЬТУРЫ****Смирнова И.Э., Саданов А.К.***ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, e-mail: iesmirnova@mail.ru*

Проведен сбор образцов почв и целлюлозосодержащих природных субстратов из ризосферы здоровых растений донника и люцерны в Алматинской области Казахстана. В общей сложности было собрано 84 образца, из них 46 образцов почвы и 38 образцов растительных остатков (разложившиеся листья, стебли и корешки растений). В лабораторных условиях проведено выделение целлюлолитических бактерий. Установлена высокая численность этой группы бактерий в почвах на полях донника и люцерны, которая колебалась от 10^4 до 10^5 КОЕ/г почвы в зависимости от района сбора почв. Чистые культуры бактерий были получены путем длительных пересевов культур на агаризованную среду Гетчинсона с целлюлозой, взятой в качестве единственного источника углерода и энергии, и последующего выделения бактерий из отдельных колоний. Выделено 54 чистые культуры целлюлолитических бактерий. Изучены их основные культурально-морфологические и биохимические признаки. Установлено, что в свойствах этих бактерий имелись существенные отличия. На основе культурально-морфологических и биохимических свойств поведена их идентификация и установлено таксономическое положение. Показано, что выделенные бактерии относятся к родам *Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas* и *Cellulomonas*. Поведен первичный скрининг 54 чистых культур бактерий по признаку целлюлазной активности. В результате скрининга было отобрано 10 штаммов бактерий, обладающих средней и высокой степенью целлюлазной активности. Отобранные штаммы бактерий могут быть использованы для создания биопрепаратов, повышающих всхожесть семян кормобобовых культур донника и люцерны.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, почва, целлюлозосодержащие природные субстраты, выделение, чистые культуры, целлюлазная активность

**CELLULOLYTIC BACTERIA PROMISING FOR CREATING
BIOFERTILIZERS FOR FORAGE LEGUMES CROPS****Smirnova I.E., Sadanov A.K.***LLC «Research and Production Center for Microbiology and Virology»,
Almaty, e-mail: iesmirnova@mail.ru*

The collection of samples of soils and cellulose-containing natural substrates from the rhizosphere of healthy melilot and alfalfa plants in the Almaty region of Kazakhstan was carried out. 84 samples were collected, of which 46 – soil samples and 38 – plant residues (decomposed leaves, stems and roots). The isolation of cellulolytic bacteria was carried out in laboratory conditions. A high number of this group of bacteria was found in soils in the fields of melilot and alfalfa, which varied from 10^4 to 10^5 CFU/g soil, depending on the area of soil collection. Pure cultures of bacteria were obtained by long-term inoculation of cultures on Hutchinson's agar medium with cellulose taken as the only source of carbon and energy, and subsequent isolation of bacteria from individual colonies. 54 pure cultures of cellulolytic bacteria were isolated. Their main cultural, morphological and biochemical properties were studied. It was shown that bacteria had significant differences in these properties. The isolated cultures were found to belong to the genera *Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudomonas* and *Cellulomonas*. The primary screening of 54 pure cellulolytic bacteria was performed on the basis of cellulase activity. As a result of the screening, 10 strains of bacteria with medium and high degree of cellulase activity were selected. Selected bacterial strains can be used to create biological products that increase the germination of forage legumes crops melilot and alfalfa seeds.

Keywords: cellulolytic bacteria, soil, cellulose-containing substrates, isolation, pure cultures, cellulase activity

Животноводство является основным фактором, способствующим развитию национального благосостояния различных стран мира. Так, по данным ФАО, животноводство поставляет половину сельскохозяйственной продукции и обеспечивает население продовольственными и непродовольственными товарами (шерстью, кожей, шкурами), которые составляют около 20% сельскохозяйственного ВВП [1]. Основным сдерживающим фактором развития животноводства многих странах

мира является недостаточность кормовой базы [2]. Получение полноценных и дешевых кормов возможно путем развития кормопроизводства с использованием кормобобовых культур, которые дают большой урожай зеленой массы с высоким содержанием протеина [3]. Основными кормобобовыми культурами являются люцерна и донник [4]. Люцерна, одна из наиболее ценных кормобобовых культур, отличается долголетием, многоукосностью и дает высокий урожай зеленой массы.

Корма из люцерны богаты растительным белком, который содержит необходимые аминокислоты, каротин, кальций, витамин и другие важные элементы питания [5]. Другой не менее важной культурой является донник, который недостаточно используется в кормопроизводстве. Донник обладает комплексом ценных хозяйственных и эколого-биологических особенностей: нетребователен к почвам, обладает зимостойкостью, дает высокий урожай раннего корма в засушливых условиях и является солеустойчивой культурой [6]. Помимо высокой кормовой ценности, эти культуры способствуют накоплению биологического азота и гумуса в почве. Однако при выращивании донника и люцерны существует проблема низкой всхожести семян, связанная с тем, что семена этих культур имеют очень плотную и твердую оболочку, препятствующую их прорастанию (твердость семян) [7].

Для решения проблемы низкой всхожести семян применяются различные способы. Наиболее часто используют скарификацию – механическое разрушение оболочки семян с использованием специальных машин – скарификаторов [8]. Однако при применении этого способа очень часто происходит повреждение эндосперма и зародыша семян, что приводит к их поражению фитопатогенами, вызывает плесневение и загнивание проростков и, как следствие, приводит к гибели большей части посевного материала. Также скарификация – это дорогостоящий процесс, требующий специального оборудования, значительных материальных и энергетических затрат. Одним из наиболее перспективных решений этой проблемы является применение биологических препаратов на основе целлюлолитических бактерий для повышения всхожести семян. Эти бактерии синтезируют особые ферменты – целлюлазы, которые способны частично нарушать целостность твердой оболочки семян и тем самым повышать их всхожесть. Для разработки биопрепаратов такого действия необходимо выделить целлюлолитические бактерии из природных субстратов и получить новые штаммы с высокой целлюлазной активностью.

Целями настоящего исследования были выделение из природных источников целлюлолитических бактерий, получение чистых культур, изучение их основных культуральных и биохимических свойств и отбор наиболее активных штаммов, перспективных для создания биоудобрения под кормобобовые культуры донник и люцерну.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии, выделенные из образцов почв и целлюлозосодержащих растительных остатков (разложившихся стеблей, листьев, корешков растений), собранных на полях донника и люцерны в Алматинской области Казахстана.

Полевой сбор почв проводили в соответствии с ГОСТ [9]. Точечные пробы (в количестве 5 штук) отбирали на пробной площадке из одного почвенного горизонта (8–10 см) методом конверта. Объединенную пробу составляли путем смешивания пяти точечных проб массой от 200 до 250 г каждая, отобранных на одной пробной площадке. Образцы почв для выделения микроорганизмов отбирали с соблюдением правил асептики. Сбор целлюлозосодержащих разложившихся растительных остатков из ризосферы растений проводили стерильным пинцетом и помещали в стерильную тару.

Целлюлолитические бактерии выделяли на селективной среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой, взятой в качестве единственного источника углерода и энергии. Для выделения бактерий 15 г почвы разводили в 90 мл дистиллированной стерильной воды и перемешивали в шейкере при 180 об/мин в течение 2 ч. Далее проводили серию разведений, перенося 1 мл полученной суспензии в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды, и так до разведения 10^{-8} . Посев микроорганизмов проводили из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} в чашки Петри с агаризованной средой Гетчинсона, на поверхность которой помещали стерильную фильтровальную бумагу. Объем посевного материала составлял 1 мл почвенной суспензии. При выделении бактерий из разложившихся природных субстратов на фильтровальную бумагу помещали кусочки величиной 1–2 мм. Затем фильтровальную бумагу и кусочки субстратов увлажняли жидкой средой Гетчинсона [10]. Каждое разведение высевали в пятикратной повторности. Засеянные чашки инкубировали в термостате при 28°C в течение 10 дней [11].

Чистые культуры бактерий получали путем ряда последовательных пересевов на среду Гетчинсона с полоской фильтровальной бумаги (1×10 см) и на агаризованную среду с водорастворимой целлюлозой – Na-карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ).

Культивирование целлюлолитических бактерий проводили на жидкой селективной среде Гетчинсона в шейкере при 180 об/мин и на твердых питательных средах (среде Гетчинсона, МПА) при температуре 28°C .

Учет численности целлюлолитических бактерий в почве проводили методом предельных разведений. Культивирование целлюлолитических бактерий осуществляли в шейкере-инкубаторе при 28 °С и 180 об/мин.

Чистоту культур микроорганизмов проверяли визуально и под микроскопом. Микроскопический контроль осуществляли с препаратами живых и фиксированных окрашенных клеток при помощи светового микроскопа с выходом на монитор компьютера.

Культуральные и физиолого-биохимические свойства для идентификации целлюлолитических бактерий исследовали по стандартным методикам [12].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [13].

Результаты исследования и их обсуждение

Для выделения целлюлолитических бактерий был проведен сбор образцов почв и целлюлозосодержащих растительных остатков (разложившихся стеблей, листьев, корней растений) на полях Алматинской области Казахстана. В общей сложности было собрано 84 образца природных субстратов, из них 46 образцов почвы и 38 целлюлозосодержащих растительных остатков. Образцы отбирали с соблюдением правил асептики.

Отбор почв и растительных остатков проводили на полях крестьянских хозяйств с высоким уровнем агротехники выращивания донника и люцерны. Из собранных образцов в лабораторных условиях на электролитической среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой осуществляли выделение целлюлолитических бактерий.

Установлено, что численность целлюлолитических бактерий в почвенных образцах была высокой и колебалась пределах от 10^4 до 10^5 КОЕ г/почвы (табл. 1).

Высокая численность целлюлолитических бактерий в почве является одной из ее положительных характеристик, так как известно, что именно представителям этой группы микроорганизмов принадлежит основная роль в круговороте углерода в природе и они отвечают за поддержание плодородия почвы. Также высокое содержание целлюлолитических бактерий в почве свидетельствует о высокой агротехнике ведения сельского хозяйства. Кроме того, целлюлолитические бактерии, находясь в почве, обогащают ее легкодоступными элементами питания, делают почву плодородной и поставляют растениям продукты своей жизнедеятельности, такие как ферменты, витамины, аминокислоты и иные, что положительно влияет на урожайность агрокультур [14, 15].

В лабораторных условиях из собранных образцов почвы и растительных остатков было проведено выделение целлюлолитических бактерий. Получение чистых культур бактерий осуществляли путем последовательных пересевов на среду Гетчинсона с полоской фильтровальной бумаги и длительным пассированием на твердой агаризованной среде Гетчинсона с Na-КМЦ до образования отдельно стоящих колоний, из которых выделяли чистые культуры бактерий.

Чистоту выделенных бактерий проверяли визуально и под микроскопом. В результате проведенной работы было выделено 54 чистые культуры целлюлолитических бактерий. Далее были изучены их основные культурально-морфологические и биохимические признаки.

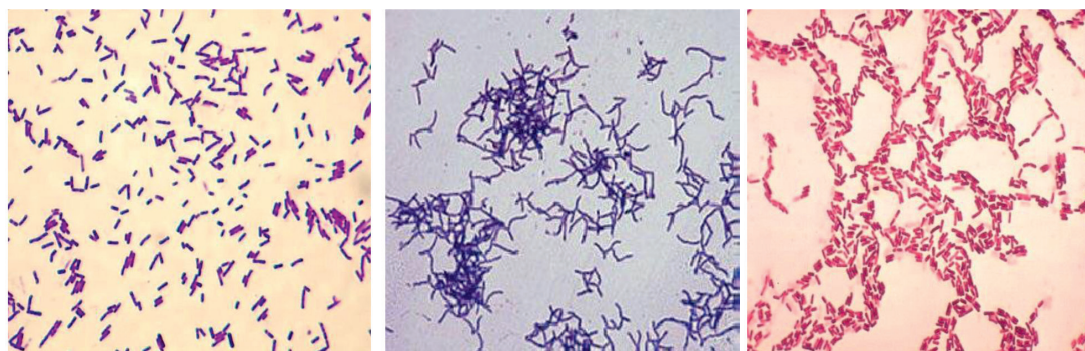
Установлено, что выделенные культуры бактерий имели существенные отличия в культурально-морфологических свойствах. Колонии бактерий, в основном, были круглые с выпуклым профилем и ровным краем, от 1,1 до 2,7 мм в диаметре с мелкозернистой структурой. Цвет колоний был преимущественно молочный, кремовый, консистенция колоний различалась.

Таблица 1

Численность целлюлолитических бактерий в почвах на полях с донником и люцерной в (Алматинская область, Казахстан, 2020 г.)

Почва	Численность микроорганизмов, КОЕ г/почвы	
	ОМЧ*	ЦЛБ**
Енбекшиказахский район	$2,7 \pm 0,2 \times 10^8$	$3,3 \pm 0,2 \times 10^5$
Карасайский район	$3,9 \pm 0,3 \times 10^7$	$4,1 \pm 0,1 \times 10^4$
Талгарский район	$4,6 \pm 0,32 \times 10^8$	$2,8 \pm 0,2 \times 10^5$

Примечание: уровень доверительной вероятности $p \leq 0,05$; * – общее микробное число; ** – целлюлолитические бактерии.



Формы клеток целлюлолитических бактерий (ув. x 1800)

Исследование морфологии клеток показало, что целлюлолитические бактерии были как спорообразующими бактериями, так и неспорообразующими. Однако спорообразующие бактерии встречались значительно чаще. Форма клеток бактерий была, в основном, палочковидная, у некоторых штаммов с возрастом клетки приобретали кокковидную форму. Бактерии были преимущественно грамположительными подвижными палочками, реже встречались грамотрицательные культуры (рисунок).

Исследование биохимических признаков бактерий показало, что все исследуемые культуры были каталазоположительными, аэробными или факультативными анаэробными бактериями. Установлено, что штаммы бактерий характеризовались различной способностью использовать соединения углерода для своего конструктивного и энергетического метаболизма.

На основе изучения культурально-морфологических и биохимических признаков выделенные культуры целлюлолитических бактерий были идентифицированы и отнесены к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bacterium* и *Cellulomonas*.

Далее был проведен первичный скрининг бактерий по признаку активности целлюлитических ферментов. В работе использовали метод, основанный на гидролизе водорастворимой целлюлозы целлюлолитическими бактериями.

Первичный скрининг целлюлолитических бактерий показал, что из 54 чистых культур только 20 штаммов обладают повышенной активностью целлюлаз. Результаты целлюлазной (КМЦ-аза) активности наиболее перспективных штаммов представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что из 20 штаммов бактерий 10 культур характеризовались средним уровнем активности целлюлаз (3,1–3,5 ед/мл), 6 штаммов обладали ак-

тивностью выше средней (3,6–4,4 ед/мл) и 4 штамма (С-21Е, С-21N2, С-21(8)N, С-22TN) характеризовались высокой активностью целлюлаз (4,5–4,6 ед/мл). Для дальнейшей работы были отобраны 10 штаммов бактерий, у которых активность целлюлаз была выше средней и высокой.

Таблица 2

Изучение целлюлазной активности штаммов бактерий

Штаммы бактерий	КМЦ-азная активность, ед/мл
С- 02Е	3,1 ± 0,01
С-08К	3,3 ± 0,03
С-08N	3,4 ± 0,02
С-09К	3,0 ± 0,01
С-14Т	3,5 ± 0,02
С-18Т	3,7 ± 0,02
С-20/2К	3,1 ± 0,01
С-20/3К	3,6 ± 0,02
С-20Т	4,2 ± 0,03
С-21Е	4,5 ± 0,02
С-21N2	4,6 ± 0,01
С-21(8)N	4,5 ± 0,03
С-21(1)N	3,8 ± 0,02
С-22Т	3,4 ± 0,01
С-22TN	4,6 ± 0,02
С-33К	3,3 ± 0,01
С-34N	4,0 ± 0,01
С-36Е	4,1 ± 0,02
С-46К	4,1 ± 0,02
С-54Т	4,2 ± 0,02

Примечание: уровень достоверной вероятности $p \leq 0,01$.

Заключение

Таким образом, проведен сбор образцов почв и целлюлозосодержащих раститель-

ных остатков на полях Алматинской области Казахстана. В общей сложности было собрано 84 образца, из них 46 образцов почв и 38 образцов целлюлозосодержащих растительных остатков. В лабораторных условиях из собранных образцов провели выделение целлюлолитических бактерий на селективной среде Гетчинсона. В результате проведенной работы было выделено 54 чистые культуры целлюлолитических бактерий. Провели изучение их основных культурально-морфологических и биохимических признаков, которое позволило определить таксономическую принадлежность целлюлолитических бактерий. Установлено, что выделенные культуры целлюлолитических бактерий относятся к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bacterium* и *Cellulomonas*. Проведен первичный скрининг бактерий по признаку целлюлазной активности. Установлено, что из 54 культур только 20 штаммов бактерий обладали повышенной активностью целлюлаз. В результате скрининга отобрано 10 штаммов бактерий, обладающих средней и высокой степенью целлюлазной активности. Отобраные для дальнейших исследований штаммы целлюлолитических бактерий будут использованы для создания биопрепаратов, повышающих всхожесть семян донника и люцерны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP08855656.

Список литературы

- 1 Lovell S.J. Sustainable animal agriculture: the role of economics in recent experience and future challenges. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.fao.org/3/t0582e/T0582E06.htm> (дата обращения: 12.01.2021).
- 2 Красовская А., Веремей Т. Особенности биологии и технологии возделывания кормовых бобов. [Электронный ресурс]. URL: <http://agrotime.info/?p=15619> (дата обращения: 15.01.2021).
- 3 Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Front. Plant Science*. 2018. Vol. 9. P. 1314. DOI:10.3389/fpls.2018.01314.
- 4 Roy A.K., Malaviya D.R., Kaushal P. Genetic improvement of fodder legumes especially dual purpose pulses. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2016. Vol. 76(4). P. 608–625. DOI: 10.5958/0975-6906.2016.00076.6.
- 5 Соболева Н.В., Бабичева И.А., Карамаяев С.В., Карамаяева А.С. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2016. № 5(61). С. 103–105.
- 6 Тимошкин О.А., Тимошкина О.Ю. Селекция донника двулетнего // *Нива Поволжья*. 2012. № 1. С. 63–67.
- 7 Косолапов В.М., Костенко С.И., Филиппко С.В. Направления и задачи селекции кормовых трав в России // *Достижения науки и техники АПК*. 2018. № 2. С. 21–24. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10205.
- 8 Ли А., Алланиязов С.У., Рузиев Ш.Н. О физико-механических свойствах и приемах уборки и очистки семян люцерны // *Агроинженерия*. 2018. № 3(85). С. 17–24.
- 9 ГОСТ 17.4.4.02-84 – Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического анализа. М.: Стандаринформ, 2008. 142 с.
- 10 Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1995. 224 с.
- 11 Saha B., Roy S., Hossen F. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. *American Journal of Microbiological Research*. 2019. Vol. 7(3). P. 83–90. DOI: 10.12691/ajmr-7-3-3.
- 12 Ившина И.Б. **Большой практикум по микробиологии**. СПб.: Наука, 2014. 112 с.
- 13 Боровиков В.П. **Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA**. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.
- 14 Шмидт К.Н., Худайгулов Г.Г. Выделение новых штаммов-деструкторов целлюлозы, их роль в снижении антропогенной нагрузки на экосистему // *Вестник Южно-Уральского государственного университета*. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2016. № 4. С. 54–63.
- 15 Саданов А.К., Смирнова И.Э. Целлюлолитические бактерии и их применение в сельском хозяйстве. Караганда: Литера, 2015. 260 с.