

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗЛАГАЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Буганковой Дарьи Алексеевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

Е. В. Глинская

Заведующий кафедрой:

д.б.н., доцент

Д. В. Уткин

Введение. Целлюлозоразлагающие микроорганизмы (ЦРМ) – это обширная и очень разнообразная группа организмов, обладающих уникальной способностью к расщеплению целлюлозы, которая является ключевым элементом структуры растительных клеточных стенок. Эта группа микроорганизмов, известных как целлюлозолитики, включает в себя представителей из множества различных таксонов, таких как клостридии, некоторые виды актиномицетов, миксобактерии, а также представители коринеформных бактерий [1, 2]. Исследования этих микроорганизмов играют важную роль в понимании сложных процессов, происходящих в природе, в частности, в круговороте углерода в экосистемах. Кроме того, они имеют огромное значение для разработки и внедрения эффективных методов переработки биомассы и создания нового поколения биотоплива [3].

К биологическим характеристикам целлюлозоразлагающих микроорганизмов относятся разнообразие морфологических и физиологических особенностей, которые обеспечивают им способность к адаптивному выживанию в условиях окружающей среды.

Целлюлозоразлагающие бактерии обладают уникальным набором ферментов, которые они используют для расщепления сложных структур целлюлозы. Этот процесс позволяет им выживать в разнообразных экологических условиях, где другие организмы не могут адаптироваться при минимальном воздействии факторов среды. Углубленное изучение ЦРМ открывает новые перспективы для экологии и биотехнологии, помогая нам понять механизмы, благодаря которым они выполняют свою роль в природных циклах [1-3]. Эти данные могут быть использованы для разработки устойчивых технологий переработки отходов, производства биотоплива и создания эффективных методов борьбы с загрязнением. Изучение данных бактерий позволяет более эффективно использовать потенциал природы в наших интересах, что является важным шагом к устойчивому развитию [4].

Антропогенное воздействие на экосистемы приводит к изменению структуры и функционирования сообществ микроорганизмов иловых

отложений. Целлюлозоразлагающие микроорганизмы являются важными индикаторами состояния водных экосистем. Анализ их разнообразия и активности позволяет оценить степень деградации иловых отложений, а также их способность к естественному восстановлению [5]. Устойчивость данных микроорганизмов к загрязняющим веществам и способность к биоремедиации открывают перспективы для разработки методов восстановления экосистем в прудах Зеркальный и Карамян в условиях интенсивного антропогенного воздействия.

Целью работы стало определение биологических свойств целлюлозоразлагающих микроорганизмов иловых отложений прудов Зеркальный и Карамян (г. Саратов).

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи.

1 Выделить и провести количественный учет целлюлозоразлагающих микроорганизмов иловых образцов исследуемых водоёмов.

2 Изучить биологические свойства выделенных штаммов микроорганизмов.

3 Определить целлюлолитическую активность исследуемых культур.

Структура и объем работы. Работа изложена на 48 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, заключение, список использованных источников, содержащий 42 наименования.

Научная новизна и значимость работы. В ходе исследования впервые для прудов Зеркальный и Карамян охарактеризован видовой состав целлюлозоразлагающих бактерий, представленный *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* и *B. pumilus*. Установлены количественные показатели содержания целлюлозоразлагающих микроорганизмов в донных отложениях исследованных водоёмов, а также проведена сравнительная оценка их

субстратного спектра и целлюлозолитической активности. Показаны различия в метаболическом потенциале выделенных видов, включая особенности использования источников углерода и азота.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке биотехнологических подходов к утилизации целлюлозосодержащих отходов, а также в процессах биологической очистки донных отложений и водных экосистем и системах биоремедиации загрязнённых водоёмов. Они представляют интерес для применения в переработке отходов текстильной, бумажной и сельскохозяйственной промышленности, где формируются значительные объёмы целлюлозосодержащих материалов, а также могут быть использованы в деятельности природоохранных организаций и на экостанциях при разработке мероприятий по восстановлению качества водных экосистем.

Основное содержание работы. В обзорной части работы систематизированы сведения о распространении, таксономической структуре и метаболическом потенциале целлюлозоразлагающих микроорганизмов (ЦРМ). Анализ литературных данных показывает, что универсальные механизмы разложения целлюлозы обеспечивают способность ЦРМ к доминированию в анаэробных и переходных зонах донных осадков независимо от уровня антропогенной нагрузки. Это определяет актуальность исследования, направленного на оценку биоремедиационного потенциала целлюлозоразлагающих комплексов иловых отложений и перспектив их использования для восстановления антропогенно нарушенных экосистем.

В экспериментальной части работы проведено выделение и количественный учёт целлюлозоразлагающих бактерий из проб ила прудов Зеркальный и Карамян. На первом этапе с использованием селективной среды Хетчинсона–Клейтона из образцов ила выделены чистые культуры микроорганизмов. Идентификация выделенных изолятов осуществлялась с использованием определителя бактерий Берджи (2005) на основе анализа фенотипических признаков, а также методом MALDI-TOF масс-

спектрометрии. Для полученных изолятов определены субстратный спектр (источники углерода и азота) и устойчивость к абиотическим факторам. Сопоставление полученных данных позволило охарактеризовать видовое разнообразие, физиолого-биохимические особенности и экологический потенциал выделенных штаммов.

Материалы и методы. В работе использовали 7 образцов ила с пруда «Зеркальный». Пробы под номерами 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12. А также 4 образца ила из пруда «Караян» под номерами 3, 8, 10 и 12. Данные пробы отобрали с учетом всех различий глубин водоёмов: в мелководной зоне, в самой глубокой части пруда и на пограничных участках между разноглубинными зонами. Этот подход обеспечил охват всех характерных участков прудов Зеркальный и Караян, а также позволил систематизировать данные для последующего изучения. Отбор проб выполняли методом точечных проб в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.01-80 «Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязнённость».

Для выделения целлюлозоразлагающих микроорганизмов использовали метод последовательного разведения и посева на плотные питательные среды.

Для приготовления суспензии илов отбирали по 1 г ила из каждой пробы и суспензировали в 99 мл стерильного физиологического раствора. Каждую из колб, встряхивали для обеспечения дисперсности суспензии. В результате получали рабочее разведение 1:100 (10^{-2}). По 0,1 мл суспензии высевали на питательные среды.

Культивирование бактерий проводили на селективной среде Хетчинсона - Клейтона следующего состава (г/л): целлюлоза - 10 г; NaNO_3 - 2,5 г; K_2HPO_4 - 1 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г; NaCl - 0,1 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 г; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 г; голодный агар - 20,0 г, H_2O - 1 л.

Посевы инкубировали в термостате при температуре +28 °С в течение 2-4 суток [6].

Идентификацию бактерий проводили на основании изучения фенотипических свойств по определителю бактерий Берджи. (2005) [1]. Контроль видовой идентификации осуществляли с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии, который осуществляли на приборе MALDI масс-спектрометре серии microflex (Bruker Daltonics GmbH, Германия) на базе ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора при участии научного сотрудника Щербаковой Н.Е.

Субстратный спектр целлюлозоразлагающих бактерий изучали с помощью комплекса биохимических тестов путём высева исследуемых штаммов микроорганизмов на плотные питательные среды с различными источниками специфических субстратов, которые способны использовать изучаемые бактерии. Для определения способности исследуемых штаммов образовывать кислоты из углеводов применяли следующие сахара: глюкоза, сахароза, арабиноза, ксилоза, лактоза, мальтоза, а также полиспирты: сорбит и маннит.

Субстратами для определения спектра разложения источников азота были: органический азот (желатин и пептон), неорганический азот (соли аммония и молекулярный азот).

Посев исследуемых культур осуществляли штрихом или уколом, инкубировали при температуре 28 °С. О ферментативной активности судили по диаметру зон гидролиза субстрата или изменению цвета индикатора среды.

Для визуализации зон гидролиза, в некоторых случаях, использовали дополнительные вещества – раствор Люголя.

Для изучения толерантности целлюлозоразлагающих бактерий к различным физико-химическим факторам среды выбрали ряд тестов наиболее важных для выживаемости выделенных микроорганизмов. Подобрали три абиотических фактора, наиболее значимых для функциональной активности ЦРБ. Наблюдая за ростом, функциями и метаболизмом бактерий, растущих в экстремальных условиях среды, можно оценить их жизнеспособность.

Для оценки влияния температурного режима на целлюлозоразлагающие микроорганизмы применяли 2 температурных режима: низкая температура (+10 °С) и высокая (+43 °С).

Влияние среды с разной кислотностью варьировали при помощи соляной кислоты и гидроксида калия, оценивали при двух уровнях pH: кислое (pH 5) и щелочное (pH 10).

Для изучения исследуемых штаммов использовали 4 концентрации NaCl в диапазоне от 5 до 15 %: 5, 7, 10 и 15 %.

В совокупности влияние температурного режима, концентрации хлорида натрия и уровня pH среды позволило оценить толерантность целлюлозоразлагающих бактерий к различным физико-химическим факторам среды [6].

Для оценки целлюлазной активности выделенных целлюлозоразлагающих бактерий использовали метод посева на плотную питательную среду с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ).

Культивирование бактерий проводили на агаризованной среде следующего состава (г/л): КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза натриевая соль) – 10 г; NH₄NO₃ - 1 г; K₂HPO₄ - 0,5 г; MgSO₄*7H₂O - 0,2 г; KCl - 0,2 г; агар – 15 г; H₂O - 1 л. pH среды доводили до 7,0 - 7,2.

Выделенные чистые культуры бактерий высевали отпечатком на поверхность агаризованной среды в центре чашки Петри. Посевы инкубировали в термостате при температуре +28 °С в течение 48 - 72 часов. Наличие целлюлазной активности оценивали визуально по образованию зон гидролиза вокруг колоний, свидетельствующих о расщеплении КМЦ бактериями. Активность считали положительной при наличии чётко видимой зоны гидролиза диаметром не менее 2 мм [7].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007 (for Windows 10), для записи использовали форму выражения $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – доверительный интервал. При проверке статистических

гипотез критический уровень показателя достоверности p принимали равным 0,05. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования.

На первом этапе исследования вычислили количественные показатели ЦРБ в прудах Зеркальный и Карамян.

Анализ полученных результатов продемонстрировал, что в пробах ила, отобранных на территории пруда Зеркальный, численность ЦРМ варьировала от 5,7 lg КОЕ/г до 6,4 lg КОЕ/г. Максимальные показатели численности бактерий зафиксировали в пробе № 12, которую отобрали на глубине 0,5 м в мелководной зоне. Минимальные показатели численности выявлены в пробе № 4, которую отобрали на глубине 3,5 м в самой глубокой части пруда. Данный результат может свидетельствовать о наличии доступного органического субстрата в пробе № 12 и его дефиците в пробе № 4.

Анализ полученных результатов показал, что в пробах ила, отобранных на территории пруда Карамян, численность ЦРМ варьировала от 5,5 lg КОЕ/г до 6,1 lg КОЕ/г. Максимальные показатели численности бактерий зафиксировали в пробе № 10, которая была отобрана на глубине между 0,5 м и 1 м в мелководной зоне. Минимальные показатели численности выявлены в пробе № 3, которая была отобрана на глубине 1,5 м в самой глубокой части пруда. Данные показатели численности микроорганизмов на пруде Карамян аналогичны показателям на пруде Зеркальный.

В ходе проведённой работы выделено 11 штаммов микроорганизмов, способных к разложению целлюлозы: *B. amyloliquefaciens*, *B. mycoides* и *B. pumilus*. В пруду Зеркальный были обнаружены *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*. В пруду Карамян – *B. amyloliquefaciens* и *B. mycoides*. Все выделенные бактерии – грамположительные спорообразующие палочки. Также определен индекс встречаемости выделенных штаммов.

На основе данных индекса встречаемости целлюлозоразлагающих бактерий пруда Зеркальный установили, что бактерии *B. amyloliquefaciens* встречается в 100% проб.

Индекс встречаемости *B. amyloliquefaciens* в пруду Карамян совпадает с индексом встречаемости в пруду Зеркальный. Установлено, что бактерия *B. amyloliquefaciens* встречается в 100 % проб. По полученным результатам можно сказать, что бактерия *B. amyloliquefaciens* преобладает в иловых отложениях обоих прудов.

Для оценки сходства микробных сообществ иловых отложений двух прудов рассчитывали индекс общности, основанный на наличии общих и уникальных видов микроорганизмов. В исследуемых образцах был выявлен один общий вид *B. amyloliquefaciens*, тогда как виды *B. mycooides* и *B. pumilus* встречались только в отдельных прудах. Значение индекса общности составило 33 %, что свидетельствует о низком уровне сходства между микробными сообществами исследуемых водоёмов.

Фенотипическая характеристика выделенных целлюлозоразлагающих бактерий позволила установить, что все исследуемые виды являются грамположительными палочковидными бактериями, способными к спорообразованию. Для всех выделенных бактерий характерно центральное расположение спор, что соответствует типичным признакам представителей рода *Bacillus*.

Исследуемые культуры различались по морфологии колоний. Штамм *B. amyloliquefaciens* ДБ1 образовывал белые непрозрачные колонии складчатой формы с изогнутым профилем и матовой поверхностью. Для штамма *B. mycooides* ДБ2 были характерны белые непрозрачные ризоидные складчатые колонии с изогнутым профилем и матовой поверхностью. Наличие ризоидной формы колоний является характерным признаком данного. Штамм *B. pumilus* ДБ3 формировал белые непрозрачные колонии круглой формы с выпуклым профилем и блестящей поверхностью. По сравнению с другими исследуемыми бактериями данный штамм отличался более правильной формой колоний и выраженным поверхностным блеском.

Таким образом, несмотря на сходство основных морфологических признаков, связанных с принадлежностью исследуемых микроорганизмов к

роду *Bacillus*, между видами выявлены различия в форме, профиле и характере поверхности колоний.

Иловые донные отложения из прудов представляет собой комплексную среду, содержащую различные органические вещества, служащие источником питания для микроорганизмов. Субстратный спектр целлюлозоразлагающих бактерий отражает их способность использовать различные формы целлюлозы и других полисахаридов, присутствующих в иловой биомассе. Анализ этого спектра позволяет оценить потенциал микробного сообщества в разложении органических веществ, а также помогает определить его роль в поддержании биохимических процессов в экосистемах водоёмов. Полученные данные могут помочь в изучении продуктивности целлюлозоразлагающих бактерий в естественных и искусственных водных системах, а также разработке новых методов биоремедиации.

По результатам экспериментальных данных установили, что исследуемые штаммы бактерий способны к образованию кислых метаболитов из различных источников углерода.

Анализ показал, что все виды используют глюкозу, сахарозу и крахмал. Штамм *B. mycooides* ДБ2 не способен к расщеплению маннита, в отличие от *B. amyloliquefaciens* ДБ1 и *B. pumilus* ДБ3, но единственный использует мальтозу. Из исследуемых бактерий только *B. amyloliquefaciens* ДБ1 утилизирует все исследованные полиспирты, использованные в исследовании. На основании полученных данных установили, что наибольшую гликолитическую активность проявил штамм *B. amyloliquefaciens* ДБ1.

Анализ способности бактерий использовать источники азота показал, что все три вида способны использовать неорганические источники азота в условиях проведённого эксперимента. Из органических источников азота в тесте на желатиназу все виды показали положительный результат. Реакция на аммиак обнаружена только у *B. mycooides* ДБ2. В ходе изучения способности бактерий использовать различные источники азота сделали вывод, что наибольшей активностью обладает штамм *B. mycooides* ДБ2

Результаты исследования по определению толерантности целлюлозоразлагающих бактерий к изменениям физико-химических факторов среды показали, что все исследуемые штаммы обладали широким диапазоном выживаемости под действием абиотических факторов (Т, рН, концентрация NaCl).

В ходе исследования установлено, что все выделенные штаммы бактерий обладают целлюлолитической активностью (рисунок 12).

У представителей *B. amyloliquefaciens* ДБ1, *B. mycoides* ДБ2 и *B. pumilus* ДБ3 наблюдалось образование хорошо выраженных полупрозрачных зон гидролиза вокруг колоний, свидетельствующих о расщеплении карбоксиметилцеллюлозы.

Формирование чётких ареол вокруг колоний указывает на способность исследуемых бактерий синтезировать внеклеточные целлюлолитические ферменты и использовать продукты гидролиза целлюлозы в процессе роста. Положительная реакция была отмечена у всех выделенных штаммов, что подтверждает их принадлежность к группе целлюлозоразлагающих микроорганизмов. Статистически достоверных различий между штаммами по диаметру зон гидролиза не выявлено.

Выводы:

1 Из донных отложений пруда Зеркальный выделено 7 штаммов целлюлозоразлагающих бактерий, идентифицированных как *B. amyloliquefaciens* и *B. mycoides*. В иловых отложениях пруда Карамян обнаружено 4 штамма целлюлозоразлагающих бактерий, относящихся к видам *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*.

2 В донных отложениях пруда Зеркальный численность целлюлозолитиков варьировала от 5,7 до 6,4 lg КОЕ/г. Для пруда Карамян установлен сопоставимый диапазон (5,5 - 6,1 lg КОЕ/г). В обоих водоёмах максимальные показатели отмечены в мелководной зоне, минимальные – в глубоководной.

3 Доминирующим видом в обоих водоёмах является *B. amyloliquefaciens*. Вид *B. mycoides* обнаружен только в пруду Зеркальный, тогда как *B. pumilus* выявлен исключительно в пруду Карамян. Индекс общности видового состава целлюлозоразлагающих бактерий прудов составляет 33 %.

4 Все выделенные штаммы утилизируют глюкозу, сахарозу и крахмал, наиболее выраженную гликолитическую активность проявил штамм *B. amyloliquefaciens* ДБ1, способный использовать максимальное число тестируемых углеводов и спиртов. Наиболее высокой активностью в отношении азотсодержащих субстратов характеризовался штамм *B. mycoides* ДБ2.

5 *B. amyloliquefaciens* ДБ1 продемонстрировал наибольшую толерантность к экстремальным условиям, сохраняя жизнеспособность при концентрации хлорида натрия 10 %, температуре 43 °С и уровню pH 10.

6 Все исследованные изоляты образуют зоны гидролиза на среде с карбоксиметилцеллюлозой, что указывает на синтез внеклеточных целлюлаз и способность к деструкции целлюлозосодержащих субстратов. Статистически достоверных различий между штаммами по диаметру зон гидролиза не выявлено.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Федоров, А. А. Жизнь растений : в 6 т. Т. 1 / А. А. Федоров. – М. : Рипол Классик, 1996. – 546 с.
- 2 Cellulases from fungi and bacteria and their biotechnological applications / A. Morana [et al.] // Nova Science Publisher. – 2011. – V. 2, №3. – P. 1-79.
- 3 Akhtar, N. Biodegradation of cellulose and agricultural waste material / N. Akhtar, D. Goyal, A. Goyal // Advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. – 2015. – V. 1, №1. – P. 211-234.
- 4 Ahmed, A. Fungal cellulases: a review of their mechanisms, production, and applications / A. Ahmed // International Journal of Health and Life Sciences. – 2018. – V. 4, №1. – P. 19-36.
- 5 Imberger, S. J. Searching for effective indicators of ecosystem function in urban streams: assessing cellulose decomposition potential / S. J. Imberger, R. M. Thompson, M. R. Grace // Freshwater Biology. – 2008. – V. 55, №10. – P. 2089-2106.
- 6 Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
- 7 Teather, R. M. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen / R. M. Teather, P. J. Wood // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – V. 43, № 4. – P. 777-780.