УДК 579.852.11

# CELLULOLYTIC ACTIVITY OF AEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA OF THE GENUS BACILLUS

**M. Razgorodin**
*National University of Food Technologies*

**Key words:**
Screening
Cellulose debris
Biodegradation
Cellulolytic enzymes
Bacteria of genus *Bacillus*

**Article history:**
Received 15.12.2013
Received in revised form 15.01.2013
Accepted 16.02.2013

**Corresponding author:**

E-mail:
npnuht@ukr.net

**ABSTRACT**

The cellulolytic activity of 18 strains of genus Bacillus has been studed. There are only 4 strains which are able to degradate the cellulose. B. licheniformis A 6/2 strain with high cellulolytic activity was selected as a result of screening in prospect B. licheniformis A 6/2 strain can be used to create the biopreparation for cellulose debris decomposition.

# ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ АЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

**М.І. Разгородін**
*Національний університет харчових технологій*

*Досліджено 18 штамів бактерій роду Bacillus, серед яких 4 штами були здатні до розщеплення целюлози. В результаті скринінгу було відібрано штам B. licheniformis A 6/2 з високою целюлазною активністю, який в подальшому може бути використаний для створення біопрепарату для розкладу целюлозовмісних решток.*

***Ключові слова:*** *скринінг, целюлозовмісні рештки, біодеструкція, целюлази, бактерій роду Bacillus.*

Целюлоза являє собою основну органічну сполуку біосфери. Кількість целюлози практично необмежена, оскільки при раціональному ведені господарства вона повністю відновлюється. Проблема утилізації нетоварної частини урожаю й особливо соломи за умов різкого скорочення поголів'я сільськогосподарських тварин до недавнього часу здебільшого розв'язувалась шляхом її спалювання. Незважаючи на технологічні і фітосанітарні переваги цього процесу, відбуваються значні втрати органічного вуглецю як самої соломи, так і гумусу, що призводило до різкого посилення процесів дегуміфікації ґрунтів. Тому, одна з основних задач сучасної біотехнології — розробка препаратів для біодеструкції рослинних целюлозовмісних залишків.

Мікроорганізми, що входять до складу таких препаратів завдяки своїм ферментним системам будуть гідролізувати целюлозу до розчинних речовини, що призведе до збільшення родючості ґрунтів, зменшення кількості фітопатогенів у рослинних рештках і ґрунті. Такий підхід може підвищити урожайність сільськогосподарських культур і мати значний економічний ефект.

Комерційні ферменти для біоконверсії целюлозовмісних матеріалів в прості легкозасвоювані цукри малодоступні через їх високу вартість, що перешкоджає їх широкому впровадженню в практику.

Вчені різних країн протягом більше 20-ти років розробляють мікробні препарати комплексної дії, здатні прискорити процеси деструкції та активізувати первинну гуміфікацію рослинних решток на ріллі [3]. У зв'язку з цим актуальним є пошук штамів мікроорганізмів, здатних продукувати різні гідролітичні ферменти, серед яких особливий інтерес представляє комплекс целюлозолітичних ферментів.

Значна частина представлених в літературі досліджень присвячена активним целюлазам грибів [2]. Проте ведуться пошуки продуцентів целюлаз серед бактерій, які, на думку вчених, мають ряд переваг: спектр і рівень антагоністичної активності, технологічність, тобто здатність до швидкого накопичення біомаси, стійкість до ліофільного висушування, життєздатність при зберіганні. Особлива увага приділяється критеріям ступеня безпеки використовуваних мікроорганізмів для здоров'я людини[4].

Біохімічна активність бацил з успіхом використовується для трансформації органічних сполук, зокрема целюлози. Мікробіологічні перетворення здійснюються завдяки використанню живих клітин або отриманих з них ферментів.

Метою нашої роботи був відбір штамів з високою целюлазолітично активністю серед бактерій роду *Bacillus*.

Об'єктом дослідження були 18 штамів бактерій роду *Bacillus* із колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного, ізольовані з різних еконіш (ґрунт, лікувальні грязі, шлунково-кишковий тракт тварин і людини та ін.). Із них до виду *B. subtilis* належало 11 штамів, *B. licheniformis* — 3, *B. pulvifaciens* — 1, *B. mesentericus* — 1, *B. megaterium* — 1, *B. cereus* — 1.

Скринінг целюлозолітичних бацил проводили на чашках Петрі в агаризованому середовищі № 15 такого складу (г/л): цитрат натрію — 1,29, $(NH_4)_2HPO_4$ — 4,75, $KH_2PO_4$ — 9,6, $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,18, при додаванні агар-агару — 8,0 [1]. Замість глюкози як джерело вуглецю вносили 0,5 % целюлози (фірми Fluka, Німеччина). Посівний матеріал вирощували у пробірках з МПА (м'ясопептоний агар) протягом 1 доби. Культивування на живильному середовищі з целюлозою здійснювали 72 години.

Зони, що утворилися в наслідок розкладу штамами целюлози виявляли за допомогою обробки чашок Петрі індикатором конгорот (0,1 %). Час експозиції становив 15 хвилин.

Для вивчення ферментів целюлазного комплексу штамів при глибинному культивуванні було використано середовище такого ж складу, але без агару. Культивування проводилося при 37 °С на качалках (швидкість обертів — 212 об/хв) в колбах об'ємом 750 мл з 50 мл середовища протягом 3 діб. Отримані культуральні рідини штамів звільняли від клітин шляхом центрифугування при 6 000 об/хв. протягом 20 хвилин.

Активність ферментів целюлазного комплексу визначали за дією культуральної рідини штаму на целюлозовмісний субстрат (кристалічна целюлоза) при 50°С протягом 1 год за концентрацією вивільнених редукуючих вуглеводів. Реакційна суміш містила 2,5 мл розчину целюлози в фосфатному буфері (pH 6,0) та 1 мл ферментного розчину (у вигляді культуральної безклітинної рідини). Вміст редукуючи вуглеводів, що вивільнились, оцінювали за модифікованим методом Шомоді-Нельсона [1]. Концентрація білку визначалась методом Бредффорда. Калібрувальний графік будували за бичачим сироватковим альбуміном. За одиницю активності ферменту брали таку його кількість, яка утворює 1 мкмоль редукуючих вуглеводів (як еквівалент глюкози) за 1 хв в перерахунку на 1 мг білку.

Взаємний антагонізм штамів бацил визначали методом радіальних штрихів. Антагоністичну активність виражали в мм зон затримки росту тест-культур.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{сер.}$), середню квадратичну похибку ($S_{x\ сер.}$), при рівнях значимості 0,05 чи 0,01. Різниця між середніми величинами досліду і контролями статистично достовірна.

Нами, встановлено, що з досліджуваних штамів лише 4 (*B. licheniformis* А 6/2, *B. subtilis* В-5001, *B. licheniformis* В-5510, *B. subtilis* 80ЛГ) здатні до розщеплення целюлози.

Найактивнішим виявився штам *B. licheniformis* А 6/2, найменш активним — *B. subtilis* А 23/2. Зона гідролізу *B. licheniformis* А 6/2 була більш прозорою та чіткою, ніж зони інших штамів, що свідчить про більш повне розкладання субстрату. Штам *B. subtilis* А 23/2 майже зовсім не гідролізував целюлозу, про що свідчить відсутність росту і зони гідролізу субстрата.

Для наступного етапу досліджень ферментативної активності було відібрано 2 штами — *B. licheniformis* А 6/2, *B. licheniformis* В-5510, що характеризувались найвищою целюлозолітичною активністю на агаризованому живильному середовищі.

За результатами досліджень штам *B. licheniformis* А 6/2 показав вищу питому целюлозолітичну активність, ніж штам *B. licheniformis* В-5510. Значення питомої активності, отримані при глибинному культивуванні штамів, корелюють з даними при поверхневому рості бактерій на твердому середовищі.. Штам *B. licheniformis* А 6/2 характеризується вищою питомою активністю та утворенням більш прозорої зони просвітлення на твердому середовищі з целюлозою.

Нами показано, що у досліджуваних штамів *B. licheniformis* А 6/2 та *B. licheniformis* В-5510 відсутній взаємний антагонізм, що свідчить про можливість створення біопрепарату на їх основі (табл.).

*Таблиця.* **Взаємний антагонізм целюлозолітичних штамів бацил**

| Штам-антагоніст | Антагоністична активність, мм зон затримки росту | |
|---|---|---|
| | *B. licheniformis* А 6/2 | *B. licheniformis* В-5510 |
| *B. licheniformis* А 6/2 | - | 0 |
| *B. licheniformis* В-5510 | 0 | - |

## Висновок

Штами *B. licheniformis* А 6/2 та *B. licheniformis* В-5510 проявляють високу целюлозолітичну активність, тому можуть бути використані в подальших дослідженнях з метою створення препарату на їх основі для розкладання целюлозовмісних решток.

## Література

1. *Варбанець Л.Д., Борзова Н.В.* Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. — Київ: Наук. Думка, 2010. — 439 с.

2. *Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М.* Скрининг штаммов бактерий с высокой целюлазной активностью //Мікробіол. журнал. — 2009. — 71, № 1. — С. 41 – 46.

3. *Петров В.Б., Щербаков А.В., Денисенко В.В., Чеботарь В.К.* Биопрепаративное управление процесами деструкции и гумификации пожнивних остатков. — СПб, Изд-во СПбГУ, 2010. — 145 с.

4. *Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А.*, Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерій рода *Bacillus* // Микробиол. журн. — 1993. — 55, — № 4. — С. 92 – 112.

# ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРІЙ РОДА *BACILLUS*

**М. Разгородін**
*Национальный университет пищевых технологий*

*Исследовано 18 штаммов бактерий рода Bacillus, среди которых 4 штамма были способны к расщеплению целлюлозы. В результате скрининга был отобран штамм B. licheniformis A 6/2 с высокой целлюлазною активностью, который в дальнейшем может быть использован для создания биопрепарата для разложения целлюлозосодержащих останков.*

***Ключевые слова:*** *скрининг, целлюлозосодержащие остатки, биодеструкция, целлюлазы, бактерии рода Bacillus.*