

УДК. 579.22

ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ИЗ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ РАЗЛИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Бахора Исмаиловна Тураева

*Старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан, к.б.н. turaevabakhora@mail.ru*

Гузал Джуманиязовна Кутлиева

*Старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан, к.б.н.*

Аннотация: *В ходе исследования чистые бактериальные изоляты были выделены культуры бактерий из желудочного сока козы, желудка кролика и курицы. Изучены морфологические особенности бактерий. Штаммы бактерий, выделенные из пищеварительных систем различных животных, были идентифицированы с помощью метода матричной лазерной десорбционно/ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-TOF).*

Ключевые слова: *Vacillus, бактерии, морфологические особенности факультативно анаэробные, целлюлаза.*

В настоящее время одной из важнейших задач биотехнологии является микробиологическая конверсия возобновляемых ресурсов биосферы, в том числе целлюлозы. Наиболее экономичным, перспективным и экологически безопасным методом переработки целлюлозного сырья является микробиологический метод. В настоящее время в разных странах мира растет интерес к использованию целлюлолитических ферментов микроорганизмов для важных технических и хозяйственных целей, что подчеркивает важность отбора активных продуцентов этих ферментов. Целлюлоза является природным полисахаридом, может представлять определенную опасность для окружающей среды, необработанная солома и лесные отходы способствуют размножению фитопатогенов.

Основу кормовой базы животных в ветеринарии составляют солома, кукуруза и различные растительные остатки (верблюжья колючка, полынь). Использование целлюлолитических ферментных препаратов в животноводстве и ветеринарии позволяет получать дополнительное мясо и молочные продукты. Ферментные препараты способствуют лучшему усвоению питательных веществ у животных. Обеспечивают поглощение организмом и снижают выход отходов, обеспечивая экономическую эффективность продукта. Особенно важно использование бактерий с целлюлолитической активностью. В мире наблюдается резкий рост населения, изменение антропогенных факторов

(глобальное потепление и охлаждение климата), что в ветеринарной сфере требуют расширения животноводства и производства продуктов из них. Целлюлоза является наиболее распространенным углеродным соединением в природе.

Она составляет 15-60% от массы растений, а в хлопке и льне содержание целлюлозы достигает 80-95%. Животные и растения не способны разлагать целлюлозу, и в этом процессе ключевую роль играют микроорганизмы. Бактерии, разлагающие целлюлозу, могут быть выделены из различных мест обитания, таких как почва, разлагающиеся растительные остатки, компосты и пищеварительная система крупного рогатого скота и жвачных животных. Целлюлолитические ферменты также выделены из нематод, термитов, короедов и других подобных организмов

[1]. Примерно $1,5 \times 10^{12}$ тонн биомассы образуется ежегодно в результате фотосинтеза, и она является практически неистощимым сырьевым источником для различных продуктов

[2]. Кроме того, гемицеллюлозы, состоящие из гетерогенной группы полисахаридов, включающих ксиланы, β -глюканы и маннаны, также являются важным структурным компонентом клеточных стенок растений

[3]. В силу их обилия переработка лигноцеллюлозных материалов необходима для углеродного цикла и требует множества трудоемких процессов, включая механические и химические методы

[4]. В природной среде деградация лигноцеллюлозных материалов происходит исключительно благодаря биологическим процессам

[5]., поэтому изучение целлюлолитических микробных сообществ и определение их роли в биодеградации органических компонентов является важным шагом

[6]. В многих странах мира основной сдерживающий фактор в развитии животноводства - нехватка кормов

[7]. Это можно преодолеть путем производства полноценного и дешевого корма, используя кормовые бобовые растения, дающие высокие урожаи зеленой массы с высоким содержанием белка

[8]. Основные кормовые бобовые – это люцерна и клевер

[9]. Люцерна, одно из ценных кормовых бобовых растений, отличается долгожительством, способностью к многократному скашиванию и высоким урожаем зеленой массы. Корм люцерны богат растительным белком, который содержит важные аминокислоты, каротин, кальций, витамины и другие важные питательные вещества

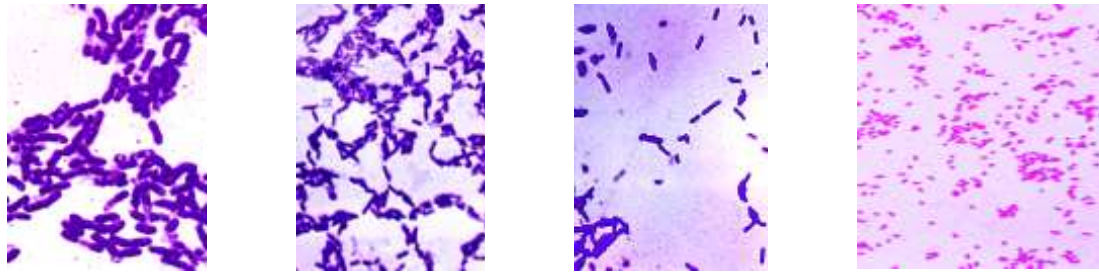
[10]. Разложение целлюлозы в природе - сложный процесс, который происходит с участием микробных сообществ, включающих как микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, так и их спутников, использующих продукты разложения. В анаэробных условиях разложение целлюлозы

осуществляется рядом анаэробных бактерий. При этом образуются различные органические кислоты (уксусная, молочная, масляная, янтарная, муравьиная), этиловый спирт, углекислый газ и водород. Разложение целлюлозы до глюкозы ферментами бактерий происходит в несколько стадий и требует участия сложного ферментативного комплекса, включающего по меньшей мере четыре фермента. Микробные целлюлазы и гемицеллюлозы, способные гидролизовать основные полимерные компоненты растительного сырья, составляют одну из доминирующих групп промышленных ферментов на мировом рынке

[11]. Методы исследования

Бактериальные штаммы, выделенные из желудочного сока козы, желудка кролика, желудка курицы инкубировали на питательных средах MRS и мясопептонном агаре (МПА) (Hi Media, Индия) при температуре 35-37 °С в течение 3 дней. В качестве инокулята использовалась суспензия спорных бактериальных штаммов с концентрацией 10^6 спор/мл. Морфологические характеристики выбранных бактериальных штаммов исследовались с использованием световых микроскопов XSP-136 В и OLYMPUS BX41 при увеличении в 400 раз и идентифицировались по традиционным методам согласно определителю Берджи. Также идентификация проводилась методом матрично-ассистированной лазерной десорбции/ионизации с масс-спектрометрией (MALDI-TOF).

На основе скрининга бактериальные штаммы с целлюлолитической активностью инкубировались на питательных средах MRS и мясопептонном агаре (МПА) (Hi Media, Индия) при температуре 35-37 °С. В качестве инокулята использовалась суспензия изолятов с концентрацией 10^6 спор/мл, выращенных в течение 3 дней. Морфологические характеристики выбранных бактериальных штаммов исследовались с помощью световых микроскопов XSP-136 В и OLYMPUS BX41 при увеличении в 400 раз. Морфологические характеристики бактериальных изолятов. Изолят бактерий из желудка кур морфологически относится к группе палочковидных бактерий. Палочки бесцветные и гладкие, толщиной 0,7 мкм и длиной до 2-8 мкм, грамположительные, образующие споры, аэробные или факультативно анаэробные. Эти признаки характерны для бактерий рода *Bacillus*, поэтому изолят идентифицирован как *Bacillus* sp. Изолят бактерий из желудка кролика также обладает схожими морфологическими признаками. Грамположительные спорные палочковидные бактерии толщиной 0,9 мкм и длиной 2-6 мкм, идентифицированы как *Bacillus* sp. Изолят микроорганизмов из желудочного сока козы представляет собой грамположительные спорные палочковидные бактерии толщиной 0,5 мкм и длиной 2-5 мкм, идентифицированные как *Bacillus* sp.



Изоляты бактерий, полученные из желудка кур
бактериальный изолят, выделенный из желудочного сока кролика
Бактериальный изолят, выделенный из желудочного сока козы
Бактериальный изолят, выделенный из желудочного сока козы

Рис. 1. Микроскопическое изображение бактериальных штаммов, выделенных из пищеварительной системы различных животных.

Изолят из желудочного сока козы также представлен грамположительными аэробными или факультативно анаэробными палочковидными бактериями толщиной 0,9-1,3 мкм и длиной 1,2-1,5 мкм, идентифицированными как *Bacillus* sp. Для достижения высокой точности идентификации бактериальных штаммов использовался метод матрично-ассистированной лазерной десорбции/ионизации с масс-спектрометрией (MALDI-TOF). Бактерии рода *Bacillus* характеризуются высокой устойчивостью их спор к внешним воздействиям, таким как УФ-излучение, высушивание и окислители, например, перекись водорода. В наших исследованиях штамм бактерий *Bacillus pumilus* показал устойчивость к перекиси водорода. Штамм *Bacillus* sp., выделенный из термита, продемонстрировал устойчивость к высокой концентрации поваренной соли. Эти бактерии образуют цепочки, связанные полисахаридами клеточной стенки, что объясняет их жизнеспособность в неблагоприятных абиотических условиях благодаря способности образовывать споры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Begun, P. The biological degradation of cellulose / P. Begun, J.P. Aubert // FEMS Microbiol Rev. – 1994. – V. 13. – P. 25–58.
2. Sukumaran, R. K. Microbial cellulases -Production, applications and challenges / R. K. Sukumaran, R. R. Singhania, A. Pandey // J Sci Ind Res.- 2005. - № 64. – P. 832–844.
3. Chen, H. Sequencing of a 1,3-1,4- β -Dglucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: Properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin / H. Chen, X.-L. Li, L. G. Ljungdahl // J Bacteriol. – 1997. - № 179. – P. 6028–6034.
4. Malherbe, S. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications / S. Malherbe, T. E. Cloete // Rev Environ Sci Biotechnol. – 2002.- № 1. – P. 105–114.

5. Maki, M. L. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers / M. L. Maki // International journal of biochemistry and molecular biology. - 2011. - № 2(2). - P. 146-154.
6. Красовская А., Веремей Т. Особенности биологии и технологии возделывания кормовых бобов. URL: <http://agrotime.info/p=15619> 15.01.2021.
7. 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.
8. 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.
9. Соболева Н.В., Бабичева И.А., Карамаев С.В., Карамаева А.С. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016. № 5(61). С. 103–105.
10. Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X (2012) Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2 (3):2012. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209017>.
11. Sajith S, Priji P, Sreedevi S, Benjamin S (2016) An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *J Nutr Food Sci* 6: 461.