

Сравнительная характеристика роста и целлюлазной активности стрептомицетов на различных субстратах

© 2021. И. Г. Широких^{1,2}, д. б. н., зав. лабораторией, в. н. с.,
 Я. И. Назарова¹, н. с., к. б. н., Н. А. Боков^{1,3}, магистрант,
 Т. Я. Ашихмина^{2,3}, д. т. н., профессор, г. н. с., зав. лабораторией,
¹Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого,
 610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а,
²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
 167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,
³Вятский государственный университет,
 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,
 e-mail: irgenal@mail.ru

Сравнивали накопление биомассы и целлюлазную активность семи почвенных изолятов стрептомицетов при жидкофазном культивировании в минеральной среде с разными источниками углерода (1% об.): микрокристаллической целлюлозой (МКЦ), фильтровальной бумагой и соломой. Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных позволил установить, что на варьирование целлюлазной активности достоверное влияние ($P \geq 0,99$) оказывают как тип субстрата, так и штамм продуцента, а также взаимодействие этих факторов. На уровень накопления биомассы достоверно влиял только тип углеродного субстрата. Солома и МКЦ в качестве единственного источника углерода, обеспечили лучший рост стрептомицетов, по сравнению с фильтровальной бумагой. В зависимости от штамма показатель накопления биомассы характеризовался слабой изменчивостью: коэффициент вариации колебался в пределах 3,0–5,7%. За период роста (15 сут) наибольшим накоплением биомассы среди исследованных штаммов отличались культуры *Streptomyces* spp. К 7.5 (0,442–0,570 г) и Мб 2-3 (0,461–0,570 г). Продукция целлюлазы исследуемыми штаммами в тесте с реагентом на основе динитросалициловой кислоты (ДНС) характеризовалась существенно более высокими значениями при утилизации фильтровальной бумаги и соломы, чем при использовании МКЦ в качестве единственного источника углерода. Выявлена приуроченность отдельных стрептомицетов-целлюлолитиков к определённому субстрату, на котором они демонстрируют наибольшую ферментативную активность. Максимальную целлюлазную активность при росте на минеральной среде с добавлением соломы проявили штаммы *Streptomyces* spp. Мб 4-2 (577,53 усл. ед./ (10 мин · г)) и 1.3. (531,37 усл. ед./ (10 мин · г)). Максимальную активность при ферментации фильтровальной бумаги продемонстрировали штаммы *Streptomyces* spp. 1.5 и К 7.5. Индивидуальная приуроченность стрептомицетов к определённому углеродному субстрату имеет практическое значение при разработке технологий и препаратов для деструкции целлюлозосодержащих отходов сельскохозяйственных и лесоперерабатывающих предприятий.

Ключевые слова: целлюлоза, стрептомицеты, углеродные субстраты, целлюлаза.

Comparative characteristics of the growth and cellulase activity of streptomycetes on different substrates

© 2021. I. G. Shirokikh^{1,2} ORCID: 0000-0002-3319-2729, Ya. I. Nazarova¹ ORCID: 0000-0002-2945-5282,
 N. A. Bokov^{1,3} ORCID: 0000-0002-1000-1192, T. Ya. Ashikhmina^{2,3} ORCID: 0000-0002-6611-8349,
¹Federal Agricultural Research Center of North-East named N. V. Rudnitsky,
 166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,
²Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch
 of the Russian Academy of Sciences,
 28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
³Vyatka State University,
 36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
 e-mail: irgenal@mail.ru

We compared the accumulation of biomass and cellulase activity during liquid-phase cultivation of seven soil isolates of streptomycetes in a mineral medium with different carbon sources (1% vol.); microcrystalline cellulose (MCC), filter paper, straw. Two-factor analysis of the obtained data allowed us to establish that the variation of cellulase activity is significantly influenced ($P \geq 0,99$) by both the type of substrate and the producer strain, as well as the interaction of these factors. The level of biomass accumulation was significantly affected only by the type of carbon substrate. Straw

and MCC as the sole carbon source provided better growth of streptomycetes, compared to filter paper. Depending on the strain, the biomass accumulation index was characterized by low variability: the coefficient of variation ranged from 3.0 to 5.7%. During the growth period (15 days), the greatest accumulation of biomass among the studied strains was observed in the cultures of *Streptomyces* spp. K 7.5 (0.442–0.570 g), Mb 2-3 (0.461–0.570 g). The production of cellulases by the studied strains in the test with the DNC reagent was characterized by significantly higher values when using filter paper and straw than when using MCC as the only carbon source. It was revealed that individual streptomycetes-cellulolytics demonstrate the greatest enzymatic activity when they are confined to a certain substrate. The strains of *Streptomyces* spp. Mb 4-2 (577.53 cond. units/(10 min · g) and 1.3 (531.37 cond. units/(10 min · g) showed the maximum cellulase activity when growing on a mineral medium with the addition of straw. The maximum activity in the fermentation of filter paper was demonstrated by *Streptomyces* spp. 1.5 and K 7.5 strains. Individual attachment of streptomycetes to a certain carbon substrate is of practical importance in the development of technologies and preparations for the destruction of cellulose-containing waste from agricultural and timber processing enterprises.

Keywords: cellulose, streptomycetes, carbon substrates, cellulose.

Ежегодно в результате деятельности сельскохозяйственных, лесозаготовительных и лесоперерабатывающих предприятий, ряда других производств накапливаются большие объёмы лигноцеллюлозных отходов, которые представляют собой одну из проблем загрязнения окружающей среды и нуждаются в эффективной переработке [1, 2]. Гидролиз лигноцеллюлозной биомассы осуществляется ферментным комплексом, включающим гемицеллюлазы, лигнолитические ферменты и целлюлазы [3]. Все целлюлазы имеют одинаковую химическую специфичность к 1,4-гликозидным связям, но они отличаются отношением к субстратам. Экзоглюканазы (ЕС 3.2.1.74) или целлобиогидролазы (1,4-β-D-глюканцеллобиогидролаза, ЕС 3.2.1.91), отщепляющие целлобиозу с конца полисахаридной цепи, обычно имеют высокую активность к кристаллической целлюлозе. Эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4) предпочитают аморфные участки целлюлозы и, в отличие от целлобиогидролаз, способны гидролизовать замещённую целлюлозу, например, карбоксиметилцеллюлозу и гидроксиметилцеллюлозу. Наконец, β-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) расщепляет целлобиозу и другие растворимые полисахариды до глюкозы [3–5].

Биотехнологическое применение целлюлаз началось в сельском хозяйстве с их использования в производстве кормов. Разработаны технологии микробиологической конверсии отходов сельского хозяйства, пищевой и зерноперерабатывающей промышленности в высококачественные углеводно-белковые кормовые добавки и комбикорма [6, 7]. Получены опытные партии компостов на основе отходов с использованием целлюлолитических микроорганизмов [8]. В последнее время микроорганизмы-целлюлолитики стали всё чаще использоваться в качестве основы почвоулучшающих биопрепаратов для более эффективной трансформации содержащих

лигноцеллюлозу растительных полимеров в компоненты гумуса [9].

Первые исследования целлюлаз были в основном сосредоточены на ферментативном комплексе грибов [3, 4, 6]. Бактериальные целлюлазы стали активно изучаться относительно недавно и расцениваются как потенциальный источник для развития коммерческих производств из-за особых оптимумов активности и субстратной специфичности [5, 8]. Рядом преимуществ в развитии биотехнологических приёмов переработки целлюлозосодержащих субстратов могут обладать, благодаря своим уникальным особенностям, представители рода *Streptomyces*. Стрептомицеты – важная часть микробного сообщества в почве, ответственная за разложение и переработку широкого спектра природных полимеров. Целлюлолитическую активность не раз отмечали у представителей порядка Streptomycetales [10–13].

Цель настоящей работы – изучить рост и целлюлазную активность семи штаммов бактерий рода *Streptomyces* при жидкофазном культивировании с использованием различных по доступности источников углерода.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили изоляты стрептомицетов из почв подзоны южной тайги Европейского Северо-Востока. Культуры были выделены из почв лесных фитоценозов (*Streptomyces* sp. Mb 4-2; Mb 2-3; T2-a4), а также из ризосферы табака (*Nicotiana tabacum*), выращенного на окультуренной дерново-подзолистой почве в условиях искусственного климата (*Streptomyces* sp. K 7.5; 1.3; 1.5).

Стрептомицеты культивировали в жидкой питательной среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 2, NaCl – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, $MnSO_4$ – 0,05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05, NH_4Cl – 2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2. В качестве единственного источника углерода использовали: микро-

кристаллическую целлюлозу (МКЦ), фрагментированные фильтровальную бумагу и солому в количестве 1% об. В колбы объёмом 250 мл с жидкой питательной средой (50 мл) вносили по 2 агаровых блока, диаметром 10 мм, вырезанных из 5-суточных газонов стрептомицетов на овсяном агаре, выращенных при 28 °С. Культивирование проводили стационарно в течение 15 сут при 28 °С. Биомассу бактерий измеряли гравиметрически после центрифугирования в течение 10 мин при 7000 об./мин и высушивания при 105 °С до постоянного веса. В надосадочной жидкости спектрофотометрически (540 нм) определяли целлюлазную активность с реактивом на основе динитросалициловой кислоты (ДНС) [14]. Активность фермента выражали в усл. ед./ (10 мин · г биомассы бактерий).

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Statgraphics. В таблицах приведены средние значения из трёх повторений и их стандартные ошибки при $P \geq 0,99$.

Результаты и обсуждение

При жидкофазном культивировании стрептомицетов с различными по биодоступности целлюлозосодержащими субстратами значительных различий по накоплению биомассы между штаммами в большинстве случаев не выявлено. Показатель накопления биомассы характеризовался слабой изменчивостью – коэффициент вариации не превышал 3,0–5,7% (табл. 1). Показано, что в среднем для данной выборки культур более эффек-

тивно утилизируются МКЦ и фильтровальная бумага, чем солома.

Так, уровень накопления биомассы на фильтровальной бумаге был близок к накоплению биомассы на МКЦ и на 20% выше, чем на соломе. Наилучшим ростом на среде с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода характеризовались штаммы *Streptomyces* sp. К 7.5. и Мб 2-3. Вместе с тем, один из штаммов *Streptomyces* sp. 1.3, на среде с МКЦ рос достоверно лучше (0,574 г), чем при утилизации других исследуемых субстратов (0,456–0,548 г). На соломе наибольшей биомассой достоверно отличался от других штамм *Streptomyces* sp. Т2а-4 (0,484г). Эти результаты позволили предположить существование у отдельных культур стрептомицетов определённых трофических предпочтений. Для проверки данной гипотезы был проведён двухфакторный дисперсионный анализ полученных экспериментальных данных (табл. 2).

Результаты анализа подтвердили преобладающее влияние на варьирование значений биомассы фактора «субстрат» ($F = 40,51$; $p < 0,0001$), но в то же время показали, что влияние другого фактора – штамма стрептомицета ($F = 0,48$; $p = 0,82$), а также влияние, обусловленное взаимодействием факторов «субстрат» × «штамм» ($F = 0,88$; $p = 0,57$), статистически оцениваются как недостоверные.

Результаты определения целлюлазной активности стрептомицетов в зависимости от типа целлюлозосодержащего субстрата представлены в таблице 3.

Ферментативная активность характеризовалась в среднем на порядок более высокими

Таблица 1 / Table 1

Биомасса стрептомицетов при жидкофазном росте в среде с разными целлюлозосодержащими субстратами / Biomass of streptomycetes during liquid-phase growth in an environment with different cellulose-containing substrates

Штамм Strain	Воздушно-сухая масса (г), среда с субстратами: Air-dry mass (g) on medium with substrates:		
	МКЦ MCC	фильтровальная бумага / filter paper	солома straw
<i>Streptomyces</i> sp. К 7.5	0,487±0,017	0,570±0,028	0,442±0,007
<i>Streptomyces</i> sp. Мб 2-3	0,532±0,08	0,570±0,008	0,461±0,015
<i>Streptomyces</i> sp. Мб 4-2	0,522±0,078	0,547±0,008	0,451±0,01
<i>Streptomyces</i> sp. Т2а-4	0,511±0,077	0,530±0,009	0,484±0,005
<i>Streptomyces</i> sp. 1.10	0,556±0,02	0,552±0,002	0,455±0,014
<i>Streptomyces</i> sp. 1.3	0,574±0,02	0,526±0,006	0,456±0,011
<i>Streptomyces</i> sp. 1.5	0,508±0,042	0,542±0,01	0,444±0,002
Среднее / Mean value	0,527	0,548	0,456
Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	5,7	3,1	3,0

Таблица 2 / Table 2

Дисперсионный анализ влияния субстрата, штамма и их взаимодействия на рост и целлюлазную активность стрептомицетов
Dispersion analysis of the effect of the substrate, strain and their interaction on the growth and cellulase activity of streptomycete

Источник варьирования Source of variation	df	SS	F	p
Накопление биомассы / Biomass accumulation				
Субстрат (фактор А) / Substrate (factor A)	2	0,0910286	40,51	< 0,0001*
Штамм (фактор В) / Strain (factor B)	6	0,00322148	0,48	0,8210
Взаимодействие факторов А×В Interaction of factors А×В	12	0,0118147	0,88	0,5763
Целлюлазная активность / Cellulase activity				
Субстрат (фактор А) / Substrate (factor A)	2	462685	432,31	< 0,0001*
Штамм (фактор В) / Strain (factor B)	6	283804	88,39	< 0,0001*
Взаимодействие факторов А×В Interaction of factors А×В	12	590408	91,94	< 0,0001*

Примечание: df – число степеней свободы, SS – сумма квадратов, F – критерий Фишера, p – уровень значимости.
* – Влияние фактора на варьирование признака достоверно при данном уровне значимости.

Note: df is the number of degrees of freedom, SS is the sum of squares, F is the Fisher criterion, and p is the significance level. * – The influence of the factor on the variation of the trait is significant at this level of significance.

Таблица 3 / Table 3

Целлюлазная активность стрептомицетов при жидкофазном культивировании в среде с разными целлюлозосодержащими субстратами
Cellulase activity of streptomycetes during liquid-phase cultivation in a medium with different cellulose-containing substrates

Штамм Strain	Целлюлазная активность, усл. ед./ (10 мин · г) (среда с субстратами): Cellulase activity, standard units/(10 min · g) in medium with substrates:		
	МКЦ MCC	фильтровальная бумага filter paper	солома straw
<i>Streptomyces</i> sp. К 7.5	41,43±3,25	313,42±78,09*	212,95±4,79
<i>Streptomyces</i> sp. Мб 2-3	75,19±11,28	264,01±10,16*	119,90±6,84
<i>Streptomyces</i> sp. Мб 4-2	86,80±13,02	277,08±2,45	577,53±14,39*
<i>Streptomyces</i> sp. Т2а-4	218,56±14,3	193,84±7,97	247,72±5,76
<i>Streptomyces</i> sp. 1.10	48,1±15,56	234,94±0,38	326,72±6,77*
<i>Streptomyces</i> sp. 1.3	152,68±2,03	322,80±2,79	531,37±27,25*
<i>Streptomyces</i> sp. 1.5	30,76±0,16	330,09±8,93*	132,38±25,10
Среднее / Mean value	93,36	276,60	306,94
Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	73	18	59

Примечание: * – приуроченность штамма к определённому субстрату.

Note: * – affinity of the strain to specific substrate.

значениями при росте стрептомицетов в минеральной среде с добавлением таких субстратов, как солома (306,94 усл. ед./ (10 мин · г)) и фильтровальная бумага (276,6 усл. ед./ (10 мин · г)), чем при росте в среде с МКЦ (93,36 усл. ед./ (10 мин · г)). Отдельные штаммы различались между собой по величине продукции целлюлазы гораздо значительнее, чем по накоплению биомассы. Более выраженной оказалась и изменчивость целлюлазной активности у отдельных штаммов в зависимости от вида субстрата. Если при росте стрепто-

мицетов в среде с фильтровальной бумагой коэффициент вариации значений целлюлазной активности (18%) характеризует слабую изменчивость признака, то при росте в среде с соломой он увеличился более чем втрое (59%) для этой же выборки культур микроорганизмов. Максимальное варьирование показателя продукции целлюлазы (73%) наблюдали при выращивании стрептомицетов в среде с МКЦ в качестве единственного источника углерода.

По показателю целлюлазной активности при росте на соломе в качестве единственного

источника углерода лидировали культуры *Streptomyces* spp. Мб 4-2 (577,53 усл. ед./ (10 мин · г)) и 1.3 (531,37 усл. ед./ (10 мин · г)). При разрушении фильтровальной бумаги выделились штаммы *Streptomyces* sp. К 7.5 (313,42 усл. ед./ (10 мин · г)), *Streptomyces* sp. 1.3 (322,80 усл. ед./ (10 мин · г)), *Streptomyces* sp. 1.5 (330,09 усл. ед./ (10 мин · г)). МКЦ наиболее активно ферментировали *Streptomyces* sp. Т2а-4 (218,56 усл. ед./ (10 мин · г)) и *Streptomyces* sp. 1.3 (152,68 усл. ед./ (10 мин · г)). Таким образом, штамм *Streptomyces* sp. 1.3 показал достаточно высокую целлюлазную активность (от 152,68 до 531,37 усл. ед./ (10 мин · г)) на всех субстратах, исследованных в работе.

В результате двухфакторного дисперсионного анализа полученных данных установлено достоверное влияние на варьирование величины целлюлазной активности фактора «штамм» ($F = 88,39; p < 0,0001$) и взаимодействия факторов «субстрат» × «штамм» ($F = 91,94; p < 0,0001$). Однако наибольший вклад в общее варьирование признака, как и в случае с варьированием биомассы, внёс фактор «субстрат» ($F = 432,31; p < 0,0001$). Влияние субстрата на целлюлазную активность стрептомицетов в 4,9 раза превосходило влияние индивидуальных физиолого-биохимических особенностей штамма и в 4,7 раза – влияние взаимодействия исследуемых факторов.

Сопоставление полученных результатов с литературными данными [15, 16] подтвердило факт приуроченности стрептомицетов-целлюлолитиков к определённому субстрату, на котором они демонстрируют наибольшую ферментативную активность. Шесть из семи протестированных штаммов стрептомицетов показали индивидуальную приуроченность к определённому углеродному субстрату, и только целлюлазная активность изолята *Streptomyces* sp. Т2а-4 характеризовалась близкими значениями при росте на МКЦ, фильтровальной бумаге и соломе. Штаммы *Streptomyces* spp. К 7.5, Мб 2-3 и 1.5 продемонстрировали наиболее высокую целлюлазную активность при ферментации фильтровальной бумаги, а штаммы *Streptomyces* spp. Мб 4-2, 1.10 и 1.3 – при ферментации соломы. Индивидуальную приуроченность стрептомицетов к определённому углеродному субстрату необходимо учитывать в практической деятельности при разработке технологий и препаратов для деструкции целлюлозосодержащих отходов.

Работа выполнена в рамках государственных заданий № 0767-2019-0090 «Изучить потенциал полифункционального действия мицелиальных микроорганизмов в региональных типах почв с целью создания новых препаратов для повышения адаптивности и экологической безопасности растениеводства и защиты окружающей среды от загрязнений» и № 0414-2018-0003 «Оценка и прогноз отсроченного техногенного воздействия на природные и трансформированные экосистемы подзоны южной тайги».

References

1. Isikgorand F.H., Becer C.R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers // *Polymer Chemistry*. 2015. V. 6. No. 25. P. 4497–4559. doi: 10.1039/C5PY00263J
2. Deswal D., Sharma A., Gupta R., Kuhad R.C. Application of lignocellulolytic enzymes produced under solid state cultivation conditions // *Bioresource Technology*. 2012. V. 115. P. 249–254. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.023
3. Sukumaran R.K., Singhania R.R., Pandey A. Microbial cellulases-production, applications and challenges // *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2005. V. 64. No. 11. P. 832–844.
4. Miettinen-Oinonen A., Paloheimo M., Lantto R., Suominen P. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton // *Journal of Biotechnology*. 2005. V. 116. No. 3. P. 305–317. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.10.017
5. Sadhu S., Maiti T.K. Cellulase production by bacteria: a review // *British Microbiology Research Journal*. 2013. V. 3. No. 3. P. 235–258. doi: 10.9734/BMRJ/2013/2367
6. Han Y.W., Anderson A.W. The problem of rice straw waste a possible feed through fermentation // *Economic Botany*. 1974. V. 28. No. 3. P. 338–344. doi: 10.1007/BF02861429
7. Bellamy W.D. Production of single-cell protein for animal feed from lignocellulose wastes // *Ruminant nutrition: selected articles from the world animal review*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Accessed. 2020. V. 30 [Internet resource] <http://www.fao.org/3/x6512e/X6512E12.htm> (Accessed: 09.04.2021).
8. Shweta A. Cellulases of bacterial origin and their applications: A review // *International Journal of Science and Research*. 2012. V. 3. P. No. 10. 1652–1655.
9. Zhang F., Huo Y., Cobb A.B., Luo G., Zhou J., Yang G., Zhang Y. *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. P. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2018.00848

10. MacKenzie C.R., Bilous D., Schneider H., Johnson K.G. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. V. 53. No. 12. P. 2835–2839. doi: 10.1128/aem.53.12.2835-2839.1987
11. Saini A., Aggarwal N.K. Enhanced endoglucanase production by soil inhabiting *Streptomyces* sp. strain NAA9 using lignocellulosic biomass // *Energy Sources. Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 2019. V. 41. No. 13. P. 1630–1639. doi: 10.1080/15567036.2018.1549138
12. Takasuka T.E., Book A.J., Lewin G.R., Currie C.R., Fox B.G. Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces* // *Scientific Reports*. 2013. V. 3. Article No. 1030. doi: 10.1038/srep01030
13. Saini A., Aggarwal N.K., Sharma A., Yadav A. Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes // *Enzyme Research*. 2015. Article No. 279381. doi: 10.1155/2015/279381
14. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. 1959. V. 31. No. 3. P. 426–442. doi: 10.1021/ac60147a030
15. Alam M.Z., Sultana M. Isolation, identification and characterization of four cellulolytic actinomycetes and their cellulases // *Chittagong University Journal of Biological Sciences*. 2013. V. 6. P. 159–173. doi: 10.3329/cujbs.v6i1-2.17241
16. Alam M.Z., Manchur M.A. Anwar isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis* // *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004. V. 7. P. 1647–1653.