

NEW POSSIBILITIES FOR THE APPLICATION OF CELLULOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM DOMESTIC ANIMALS

Kutlieva G.J., Turaeva B.I., Kamolova H.F.

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Abstract: the most important rumen microorganisms are cellulolytic. These bacteria break down and digest fiber, which is of great importance for the nutrition of ruminant animals. The rumen microflora of ruminants is a diverse community of bacteria, fungi and protozoa. Ruminant animals have a mechanism of symbiosis with microorganisms, which allows them to digest plant feed. Many commercial enzymes for the bioconversion of cellulose-containing materials into simple, easily digestible sugars are not readily available due to their high cost, which hinders their implementation in practice. In this regard, it seems relevant to search for strains of bacterial microorganisms capable of producing various hydrolytic enzymes, among which the complex of cellulolytic enzymes is of particular interest.

During research, more than 20 strains of bacteria were isolated from the rumen of domestic animals. In order to search for producers of cellulolytic enzymes, a screening of isolated aerobic spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* was carried out; 4 strains of *Bacillus subtilis* have the ability to decompose carboxymethylcellulose and cellobiose.

Keywords: microorganisms, cellulose, cellulolytic activity, enzyme, carboxymethylcellulose, cellobiose, glucose, endoglucanase, cellobiase.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Кутлиева Г.Дж., Тураева Б.И., Камолова Х.Ф.

Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан

Аннотация: самые важные микроорганизмы рубца – целлюлозолитические. Эти бактерии расщепляют и переваривают клетчатку, что имеет большое значение для питания жвачных животных. Микрофлора рубца жвачных животных представляет собой разнообразное сообщество бактерий, грибов и простейших. У жвачных животных действует механизм симбиоза с микроорганизмами, позволяющий переваривать растительные корма. Многие коммерческие ферменты для биоконверсии целлюлозосодержащих материалов в простые легкоусвояемые сахара малодоступны из-за их высокой стоимости, что препятствует их внедрению в практику. В этой связи актуальным представляется поиск штаммов микроорганизмов-бактерий, способных продуцировать различные гидролитические ферменты, среди которых особый интерес представляет комплекс целлюлолитических ферментов.

В ходе исследований из рубца домашних животных выделено более 20 штаммов бактерий. С целью поиска продуцентов целлюлолитических ферментов был проведен скрининг выделенных аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, 4 штаммов *Bacillus subtilis* обладают способностью разлагать карбоксиметилцеллюлозу и целлобиозу.

Ключевые слова: микроорганизмы, целлюлоза, целлюлолитическая активность, фермент, карбоксиметилцеллюлоза, целлобиоза, глюкоза, эндоглюконаза, целлобиаза.

Введение. Существуют многие вопросы по повышению продуктивности, которые обусловлены физиологическими, биологическими особенностями животных. Организация налаживания полноценного качественного питания и создание новой кормовой базы животноводства, устранение причин нехватки и неполноценности кормов являются серьезными проблемами, решения которых способствовало бы повышению сохранности и продуктивности сельскохозяйственных животных. При решении данного вопроса представляет интерес способы приготовления корма с использованием микроорганизмов, в частности целлюлозоразлагающих бактерий. Они гидролизуют полимерный органический субстрат целлюлозу, образуя растворимые органические соединения.

В рубце и слепой кишке находится большое количество микроорганизмов-симбионтов, под действием которых и происходит расщепление клетчатки на соединения, легко усвояемые в пищеварительном тракте. Бактерии рубца насчитывают 10^{10} организмов на 1 мл рубцовой жидкости и представлены несколькими сотнями видов. Их объем составляет до 50% всей микробной биомассы рубца. Бактерии являются важным источником микробного белка, который обеспечивает 75-80% метаболизируемого белка жвачных животных. Бактерии также производят ферменты, которые переваривают клетчатку (целлюлоза, гемицеллюлоза), крахмал и сахара. Ресничные простейшие (инфузории) по размеру крупнее бактерий. И хотя их содержание в 1 мл рубцовой жидкости не превышает 10^6 организмов, общий их объем может составлять до 50% всей микробной биомассы. Простейшие оказывают влияние на рубцовое пищеварение: целлюлозолитические и гемицеллюлолитические простейшие переваривают частицы растений. Некоторые виды переваривают крахмал (медленнее, чем бактерии). Ряд простейших поглощает молочную кислоту, сокращая риск ацидоза. Отдельные виды способны использовать кислород, благоприятствуя созданию анаэробных условий.

Большинство ресничных простейших очень эффективно разлагают белки и выделяют аммиак. Одна протозойная клетка может проглотить до нескольких тысяч бактерий в час, поэтому они играют важнейшую роль в стабильности популяции микроорганизмов рубца. Грибы рубца составляют до 8-10% всей микробной биомассы и являются строго анаэробными. Они играют важную роль в первичном разрушении клетчатки, благодаря наличию нитчатых ризоидов, которые проникают в ткани растений. Грибы также обладают высокой ферментативной активностью по отношению к клетчатке, облегчая доступ бактерий к более переваримым тканям растений и помогая высвободить полисахариды, которые связаны с лигнином [1;2].

Перспективным направлением микробной биотехнологии является разработка пробиотических препаратов кормового назначения. При этом большое внимание уделяется пробиотикам с целлюлолитическими свойствами в связи с проблемами отечественного кормопроизводства. В последние годы структура фуражного сырья в стране претерпела значительные изменения, которые привели к вынужденному введению в корма трудно перевариваемых и низкокалорийных компонентов (отруби, рожь, овес, ячмень). Большое значение имеет отказ от применения в кормах сельскохозяйственных животных мясо-костной муки и замене ее на белок растительного происхождения (соевую муку, кукурузный глютен), продажные формы которого содержат примеси клетчатки. Это приводит к увеличению доли трудно перевариваемой клетчатки в кормах и ставит задачу повышения ее усвоения,

поскольку клетчатка оказывает существенное влияние на использование животными питательных веществ рациона. Накопление растительных отходов, обогащенных клетчаткой (пивная дробина, различные типы шротов, жомов и др.), вызывает попытки их утилизации введением в корма сельскохозяйственных животных, что также вызывает необходимость разработки препаратов, стимулирующих пищеварение клетчатки. Поэтому актуально изучение внутренних цепей питания растительноядных животных с высокой степенью переваримости клетчатковых волокон, выделение из них целлюлолитических и иных симбионтных бактерий, участвующих в пищеварении, и разработка биотехнологии промышленного получения и применения таких микроорганизмов. Злаковые культуры (овес, рожь, ячмень, пшеница и др.) широко применяются для производства кормов, используемых в животноводстве. Однако эти источники питательных веществ содержат некрахмальные полисахариды (НПС), которые отрицательно влияют на переваримость корма. Попадание растворимых НПС с кормами в желудочно-кишечный тракт моногастричных животных (домашняя птица) приводит к образованию вязких желеобразных субстанций, которые затрудняют доступ пищеварительных соков к питательным веществам, ухудшая их усвояемость [2, 3, 4]. В связи с этим возникают трудности в усвоении полисахаридов, целлюлозы, соответственно кормов.

Изучение особенностей целлюлолитической активности микроорганизмов-симбионтов рубца необходимо для улучшения переваривания, освоения клетчатки у жвачных животных, а также важно для физиологического обоснования их питания [10,15,17].

Основная проблема состоит в том, что целлюлоза очень устойчива к различным воздействиям. Поэтому постоянно идет поиск новых штаммов микроорганизмов с более высоким уровнем биосинтеза целлюлаз, а также разрабатываются биотехнологические способы использования целлюлозы и, в первую очередь, целлюлозосодержащих отходов растениеводства, органического удобрения. Подобные разработки невозможны без поиска новых штаммов продуцентов целлюлолитических ферментов [16,18]. Наши исследования направлены на поиск бактерий с целлюлолитической активностью из рубца некоторых домашних животных (кролики, домашней козы и птиц). Итак, целью настоящей работы является выделение микроорганизмов-бактерий из рубца животных и отбор штаммов с целлюлолитической активностью.

Из животных было выделено более 20 изолятов различных бактерий. Условно-патогенные бактерии были исключены из списка изучаемых бактерий. Доминантной группой среди всех выделенных микроорганизмов являются бактерии рода *Bacillus*. Отобранные штаммы идентифицированы как представители вида *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*. Для идентификации видовой принадлежности микроорганизмов использовали MALDI-TOF масс-спектрометр Bruker MicroFlex LR и специализированное программное обеспечение Maldi Biotyper (Bruker). Данные бактерии были идентифицированы с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомной РНК и определена их безвредность в Государственной ветеринарной службе Республики Узбекистан [19].

Большой интерес вызывают целлюлолитические бактерии рода *Bacillus*, которые являются важным звеном в круговороте углерода в природе и существенной частью экосистемы. В связи с этим представляется перспективным исследование возможности их

применения в качестве основы для получения нового продуцента целлюлолитических ферментов. Ранее нами были проведены исследования для определения эндогликоназной активности местных термитов *Anacanthotermes turkestanicus*, штаммы выделенные из насекомых проявили более активную целлюлазную активность, чем бактерии животных [20].

Методы исследования. В работе использовали штаммы микроорганизмов, способные к биодegradации целлюлозы, выделенные из рубца домашних животных.

Культивирование бактерий проводили в колбах на качалках в течение 2 суток при температуре 37°C на МПБ (мясо-пептонный бульон) среде, содержащей: мясной экстракт, пептон сухой ферментативный, натрий хлористый. В качестве источника углерода вносили 0,5 % натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и целлобиозы. Образование и активность ферментов целлюлазного комплекса оценивали по их воздействию на субстраты: на Na-КМЦ – эндогликаназы, на целлобиозу - целлобиазы (β -глюкозидазы). Скрининг на активность бактерий проводили в два этапа. Первый этап состоял из прямого отбора культур различных видов бактерий из их посевов на поверхность агаризованной среды с различными целлюлозосодержащими субстратами в качестве источника углерода. По диаметру зон просветления окраски вокруг выросших колоний после прокрашивания чашек красителем конго красным судили об активности продуцируемых культурами ферментов [11,13]. Активность ферментов у штаммов, отобранных в результате первичного скрининга, оценивали по способности гидролизовать растворимую, средней вязкости карбоксиметилцеллюлозу и целлобиозу.

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) или целлюлозная камедь представляет собой производное целлюлозы с карбоксиметильными группами ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$), связанными с некоторыми гидроксильными группами мономеров глюкопиранозы, которые составляют основу целлюлозы. Он часто используется в виде натриевой соли, карбоксиметилцеллюлозы натрия. Этот субстрат представляет собой анионный полиэлектролит, растворимый в воде, свойства которого позволяют использовать его в качестве загустителя, эмульгатора, адгезивного связующего, смачивателя и т. д.

Целлобиоза образуется при ферментативном гидролизе целлюлозы бактериями, обитающими в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Затем целлобиоза расщепляется бактериальным ферментом β -глюкозидазой (целлобиазой) до глюкозы, что обеспечивает усвоение жвачными целлюлозной части биомассы.

Определение общих восстанавливающих сахаров (ВС) Среди разнообразных методов количественного определения ВС наибольшее применение нашли методы Шомоди-Нельсона и метод с 3,4-динитросалициловой кислотой (ДПС). В наших исследованиях применен метод Шомоди-Нельсона. [5,7,14].

Результаты и их обсуждение.

Выделение штаммов микроорганизмов, перспективных для использования в качестве продуцента целлюлолитических ферментов из рубца домашних животных проводили на базе кафедры физиологии животных Самаркандского Университета. Культуры микроорганизмов выделяли высевом как непосредственно из представленных образцов. В качестве накопительных сред для выделения микроорганизмов были использованы жидкая среда Штаммы отбирали по их способности гидролизовать КМ-целлюлозу, целлобиозу.

В результате выделено 10 бактериальных штаммов, проявляющих целлюлазную активность. На основании данных, полученных при изучении физиолого-биохимических свойств выделенных целлюлолитических микроорганизмов [12], согласно определителю Берджи [13], 6 штаммов по совокупности признаков идентифицированы как представители рода *Bacillus* (грам-положительные прямые палочки, образующие эндоспores, подвижные, аэробы или факультативные анаэробы, 2 культуры каталазоположительные), которые были отобраны для дальнейшей работы. Отбор штаммов спорообразующих бактерий как потенциальных продуцентов целлюлаз при посеве культур на поверхность соответствующих по составу агаризованных сред показал, что культуры, которые способны образовывать активные целлюлазы, давали вокруг колоний зоны просветления, хорошо просматривающиеся после прокрашивания красителем (рис.1-3).



Рис.1. Выделенные культуры бактерий рода *Bacillus subtilis*

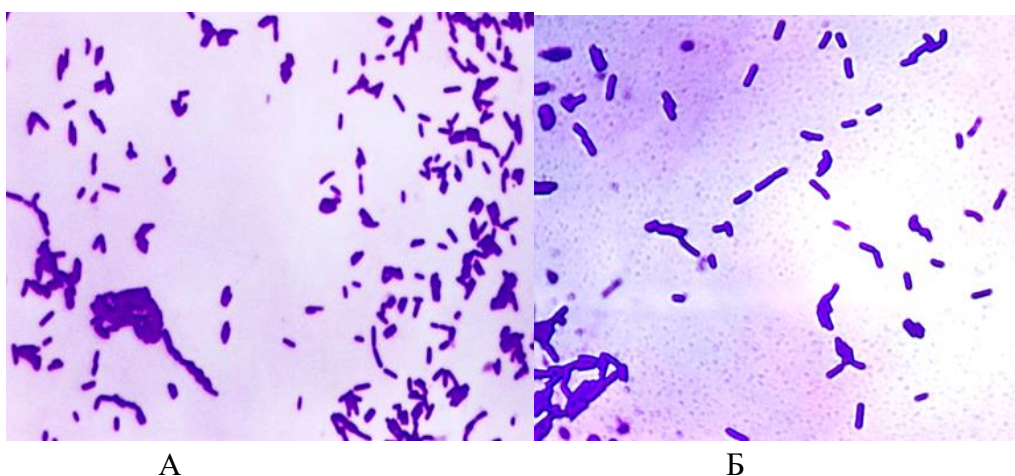


Рис.2. Выделенные штаммы бактерий из желудочного сока домашней козы *Bacillus megaterium* (А); *Bacillus pumilis* (Б).

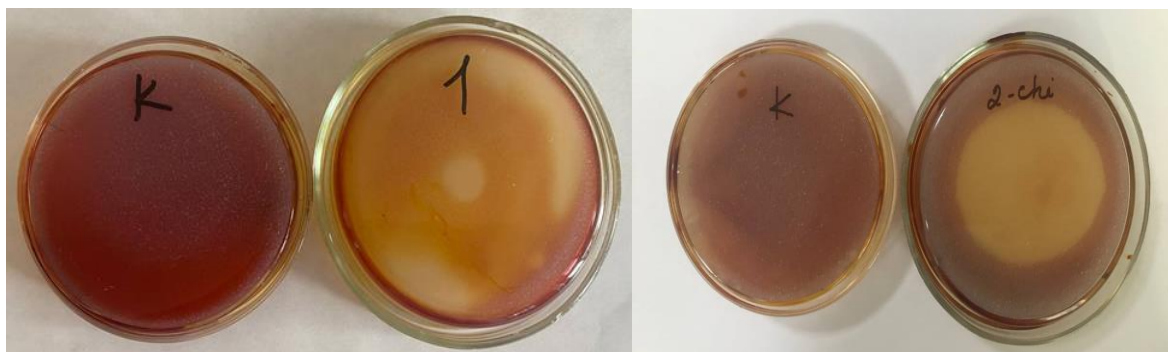


Рис. 3. Зоны гидролиза Na-КМЦ культурами бацилл.

К (контроль) - зона отсутствует, чашки с осветлением показывают гидролиз целлюлозы.

Методы исследования на чувствительность к антибиотикам. (Метод дисков) [21].

Была определена чувствительность выделенных бактерий к различным антибиотикам: рифампицин, офлоксацин, цефотаксин, ампициллин, азитромицин, эритромицин, тетрациклин, гентамицин, хлорамфеникол, ципрофлоксацин. Проведение определения чувствительности к антибиотикам позволяет определить устойчивость и чувствительность микроорганизмов к лекарственным средствам. Специальные диски фильтровальной бумаги, которые пропитанные различными растворами антибиотиков, помещаются поверх колоний микроорганизмов на питательной среде. О наличии или отсутствии роста бактерий выявляется степень чувствительности к спектру антибиотиков.

Таблица 1.

Antibiotiklar	Bacillus subtilis-1	Bacillus subtilis-2	Bacillus subtilis-3	Bacillus subtilis-4	Bacillus megaterium
Rifampicin	16	20	4	10	7
Ofloxacin	30	30	26	26	22
Cefotaxime	0	0	0	0	0
Ampicillin	0	0	0	0	0
Azithromycin	15	12	10	25	25
Erythromycin	0	0	0	0	0
Tetracycline	14	18	8	10	14
Gentamicin	0	0	0	0	24

Chloramphenicol	25	20	25	25	25
ciprofloxacin	32	32	28	0	24

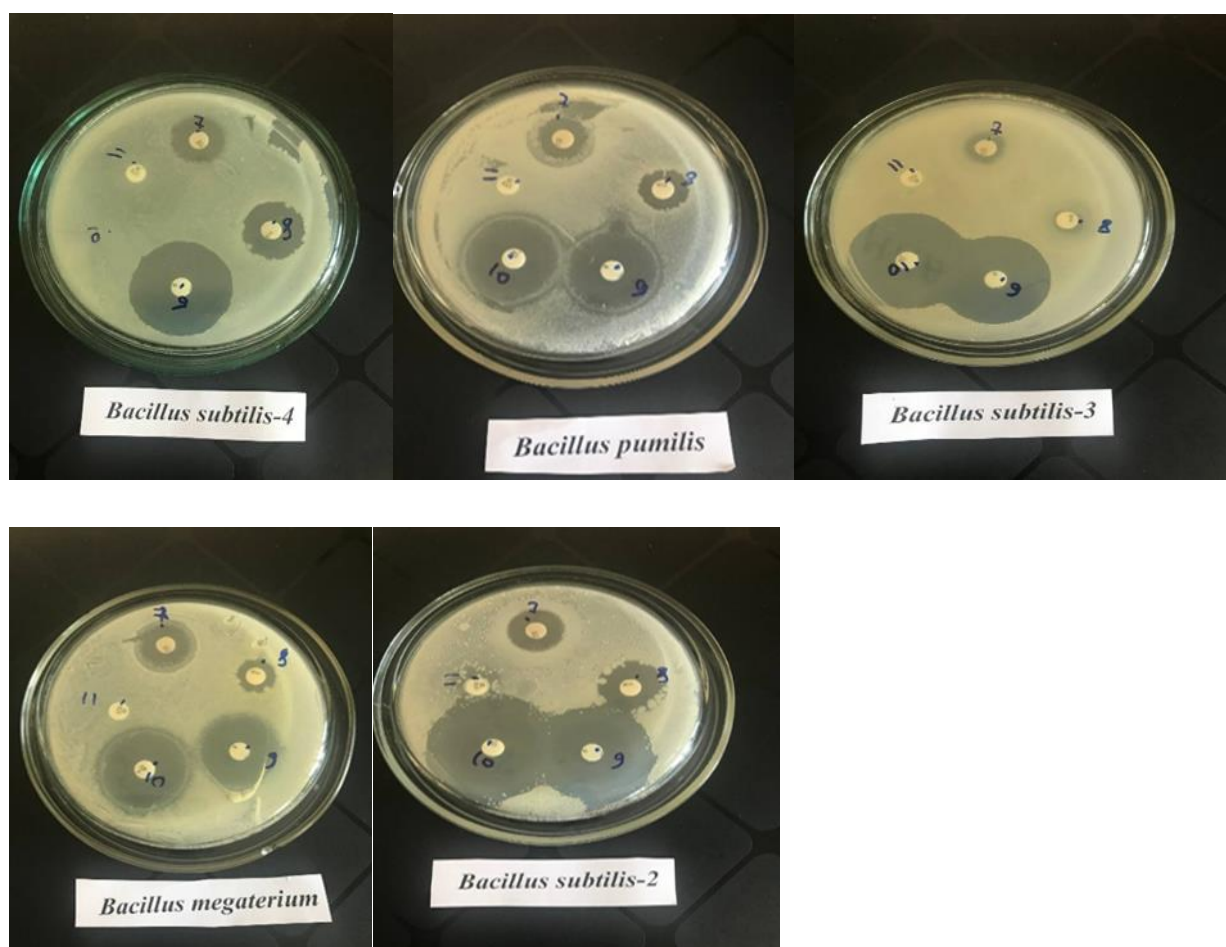


Рис. 4. Определение чувствительности к антибиотикам. (Метод дисков).

Исследования определения степени чувствительности к спектру антибиотиков показали высокую чувствительность к офлоксацину, хлорамфениколу и ципрофлоксацину. (Таблица1.) Зона подавления роста составляла от 25 до 32 мм. Следует отметить, что все исследуемые культуры проявили резистентность к антибиотикам цефотаксину, ампицилину, эритромицину и гентамицину. *Bacillus megaterium* оказался чувствительным к гентамицину. Зона чувствительности составила 24 мм.

Первичный скрининг показал, что в большинстве исследуемые штаммы, гидролизуют растворимую КМЦ, обладают способностью образовывать комплекс внеклеточных целлюлаз. Так, штаммы видов *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis* обладали способностью к образованию внеклеточных ферментов, расщепляющих Na- КМЦ.

Целлюлазную активность определяли калориметрическим методом, основанным на определении восстанавливающих сахаров (ВС), образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на субстрат – Na-КМЦ и целлобиозы. Метод основан на количественном определении редуцирующих сахаров, образующихся в результате действия фермента целлюлазы на субстрат натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), целлобиозы при температуре 50 °С. Определение количества редуцирующих сахаров проводили по методу Шомоди-Нельсона [6-9].

Калибровочная кривая для определения количества редуцирующих сахаров

Расчеты выполняются по калибровочной кривой. При создании калибровочной кривой значения D (оптической плотности) вводятся по оси X, а значения концентрации вводятся по оси Y. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при длине волны $\lambda = 610$ нм. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Excel. Были изучены среднее арифметическое (M), стандартное отклонение ($\pm m$) и статистическая достоверность (R). Результаты менее $R < 0,05$ считались статистически значимыми.

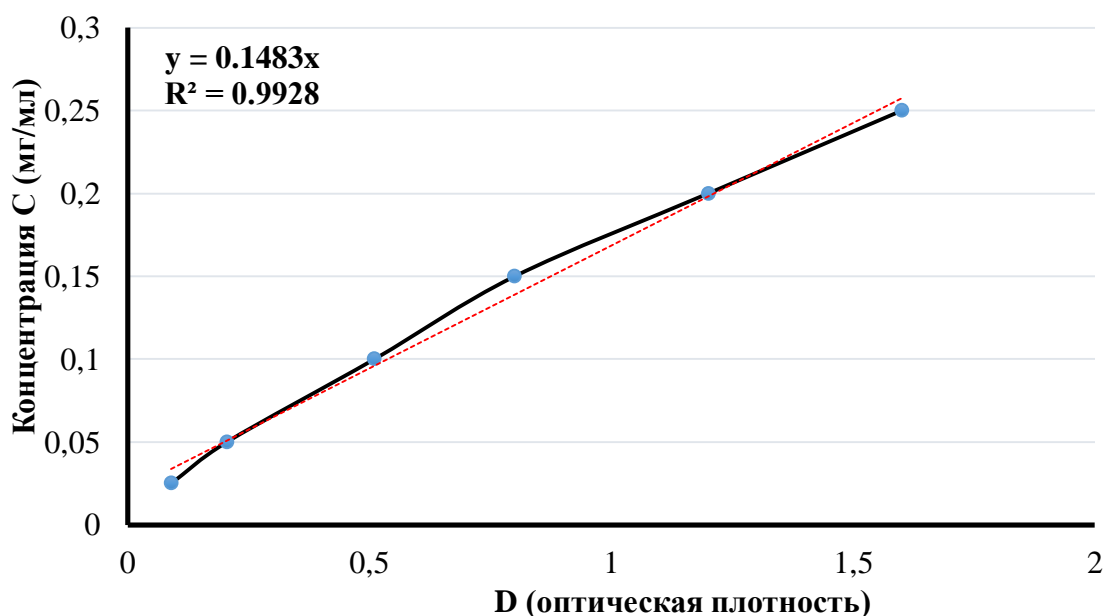
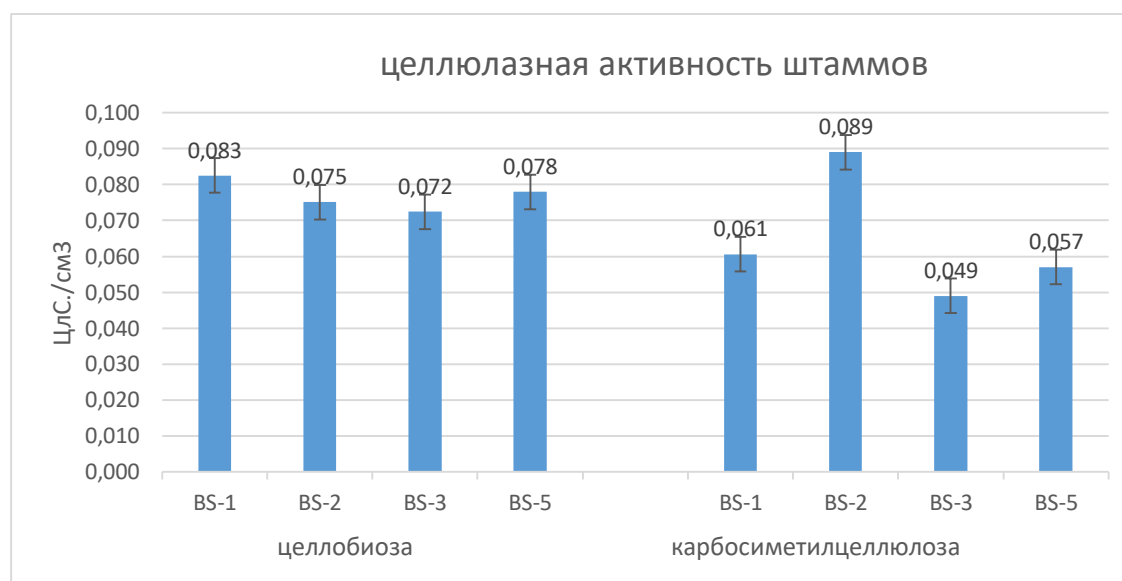


Таблица 2.

Опытные варианты, образцы №	Активность целлюлазы (ЦлС/см3)
	(целлобиоза)
BS-1	0,083±0,003
BS-2	0,075±0,002
BS-3	0,072±0,003
BS-4	0,078±0,0025
(карбосиметилцеллюлоза)	
BS-1	0,061±0,0016
BS-2	0,089±0,001
BS-3	0,049±0,0013
BS-4	0,057±0,0027



Выводы. Исследования определения степени чувствительности изучаемых целлюлолитических штаммов к спектру антибиотиков показали высокую чувствительность к офлоксацину, хлорамфениколу и ципрофлоксацину. Зона подавления роста составляет до 32 мм. Следует отметить, что все исследуемые культуры проявили резистентность к антибиотикам цефотаксину, ампицилину, эритромицину и гентамицину. Это свидетельствует о том, что бактерии, выделенные из домашних животных устойчивы к данным антибиотикам. Данные антибиотики не могут применяться для лечения животных.

Первый этап скрининга показал, что в своем большинстве исследуемые штаммы, гидролизуют растворимую КМЦ и целлобиозу. Большая часть исследуемых штаммов бацилл синтезировали эндоглюканазу, целлобиазу. Наибольшим синтезом эндоглюканазы обладали культуры №2, которые были выделены из рубца домашней козы. Активность эндоглюканазы составила $0,089 \pm 0,001$ (ЦлС/см³). Наибольшим синтезом целлобиазы обладали все культуры. Штамм № 1 обладает синтезом β -глюкозидазы $0,083 \pm 0,00$ (ЦлС/см³) (2-таблица). Целлюлазную способность (ЦлС) вычисляют в анализируемой пробе в единицах ЦлС/г или единицах ЦлС/см³.

Таким образом, в результате скрининговых исследований 4 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis* обладают эндоглюканазной и целлобиазной активностью. При определении целлюлазной активности культур наибольшим синтезом β -глюкозидазы обладают все исследуемые штаммы. Эндоглюканазной активностью обладают также все исследуемые культуры. Проведенные исследования подтвердили наличие эндоглюканазной и целлобиазной активности всех отобранных 4 культур бактерий. Данные штаммы могут быть использованы в дальнейших биотехнологических исследованиях в составе биопрепаратов, применяемых в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и обработки органических, растительных отходов. Планируются дальнейшие научные исследования с использованием данных бактерий в составе кормовых добавок для определения некоторых физиологических процессов пищеварения у домашних животных.

Список литературы:

1. Bach A. Ruminant nutrition symposium: Optimizing performance of the offspring: Nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity J. Anim. Sci., 90 (2012), pp. 1835-1845, <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4516>
2. Bedford, M., and Partridge, G. (2010) Enzymes in farm animal nutrition, CABI, UK.
3. Basic, A., Fincher, G., and Stone, B. (2009) Chemistry, Biochemistry and Biology of (1–3) β -Glucans and Related Polysaccharides, Academic Press, N.Y
4. J. Laporta, F.C. Ferreira, V. Ouellet, B. Dado-Senn, A.K. Learn more about the role of rumen microorganisms and their impact on the host's performance and health. Journal of Dairy Science (<https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-dairy-science>) Volume 103, Issue 8 (<https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-dairy-science/vol/103/issue/8>), August 2020, Pages 7555-7568.
5. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. – Москва: Наука, 1984. – 72 с.
6. Билай В.И. Пидопличко Н.М., Тарадий Г.В. Целлюлолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз // Ферментное расщепление целлюлозы. – М.: Наука, 1967. – С. 37–45.
7. Биссвангер Х. Практическая энзимология, М., ЮИНОМ. Лаборатория знаний. 2010
8. Польшгалына Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М., ДеЛи принт, 2003

9. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники, сер. Биотехнология. ВИНТИ, т.25, 1993

10. Кашаев А., Петренко А., Калашников А. Кормовые добавки на основе живых культур микроорганизмов // Птицеводство. – 2006. – № 11. – С. 43-45.

11. Клесов А.А., Рабинович М.Л. Ферментативный гидролиз целлюлозы // Биологическая химия. Итоги науки и техники. – Москва, 1982. – Т. 8, № 11. – С. 1490–1496.

12. Преображенский С.Н. Фармакодинамические основы и перспективы применения ферментных препаратов в животноводстве // Ветер. с.х. жив. – 2006. – № 1. – С. 71–75.

13. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М. Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз // В сб. "Итоги науки и техники ВИНТИ". Биотехнология. – 1988. – Т. 11. – С. 1–224.

14. Рухляева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – Москва: Легк. и пищ. промышленность, 1981. – 288 с. 48 ISSN 0201-8462. Микробиол. журн., 2009, Т. 71, № 5

15. Рядчиков В., Петренко А., Радуй А. Бацелл в кормах для кур и ремонтного молодняка // Птицеводство. – 2005. – № 1. – С. 23–24.

16. Сеницын А.П., Митькевич О.В., Калюжный С.В., Клесов А.А. Изучение синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса // Биотехнология. – 1987. – № 1. – С. 39–46.

17. Ушакова Н.А., Белов Л.П., Варшавский А.А., Козлова А.А., Колганова Т.В., Булыгина Е.С., Турова Т.П. Расщепление целлюлозы при дефиците азота бактериями, выделенными из кишечника растительноядных позвоночных // Микробиол. журн. – 2003. – 72, № 3. – С. 400–406.

18. Fumiyasu F., Toshiaki K., Koki H. Purification and Properties of a Cellulase from Alkalophilic *Bacillus* sp. № 1139 // J. of Gen. Microbiol. – 1985. – 131. – P. 3339-3345.

19. Bakhora Turaeva, Guzal Kutlieva, Khulkar Kamolova, Nigora Zukhritdinova. Isolation and identification of bacteria with cellulolytic activity from the microflora of animal juice // Journal of Wildlife and Biodiversity. -2023. -V. 7(4). -P. 241-264. <http://www.wildlife-biodiversity.com/>

20. Kutlieva G. J. Turaeva B.I. Kamolova H.F. Kuziev B.U. New possibilities of application of cellulolytic bacteria *BACILLUS SUBTILIS* isolated from local termites *anacanthotermes turkestanicus* // INTERNATIONAL ASIAN CONGRESS ON CONTEMPORARY SCIENCES VIII. Aksaray, Turkiye. -2023. 328. p.

21. Решедько Г.К. Определение чувствительности к антибиотикам: методы, результаты, оценка. <http://www.antibiotic.ru/rus/all/articles/absens.shtml>