

УДК 579.222+579.24

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВЫХ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ

© 2024 г. Н. А. Боков^{a, b, *}, А. В. Бакулина^a, Е. А. Бессолицына^a, И. Г. Широких^{a, b}

^aФедеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, 610007, Россия

^bВятский государственный университет, Киров, 610000, Россия

*e-mail: nikita-bokov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2024 г.

После исправления 30.04.2024 г.

Принята к опубликованию 01.04.2024 г.

С целью получения новых штаммов микроорганизмов-целлюлолитиков для использования в технологиях переработки растительных и других целлюлозосодержащих отходов выделены из различных источников четыре новых бактериальных штамма рода *Streptomyces*. В тестах с Конго красным у изолятов определяли способность к деструкции карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и природных целлюлозосодержащих материалов – соломы, опила березы и дуба. Количественно активность целлюлазы оценивали при ферментации соломы. На средах с каждым из модельных источников углерода определяли радиальную скорость роста, как показатель, характеризующий способность изолятов к колонизации различных субстратов. Сопряженная характеристика целлюлазной активности и радиальной скорости роста на субстратах различной природы позволила оценить перспективы дальнейшего использования исследуемых штаммов в качестве деструкторов целлюлозосодержащих отходов. Лидировал в исследованной выборке штамм *Streptomyces thermocarboxydus* T1-3, отличающийся наиболее активным ферментативным гидролизом всех модельных источников целлюлозы, высокой радиальной скоростью роста (до 87 ± 3 мкм/ч) и достижением в течение 24 ч максимальной активности целлюлазы (171.25 ± 8.13 Ед/мл) при ферментации соломы.

Ключевые слова: целлюлоза, *Streptomyces*, деструкция, эндо-ксилоглюканазы, колонизация субстрата, скорость радиального роста

DOI: 10.31857/S0026365624050111

В Российской Федерации ежегодно накапливается около 300 млн. тонн отходов сельскохозяйственного производства (солома, стебли, жмых) и целлюлозно-бумажной промышленности (лигнин), а также порядка 50 млн. тонн бытовых целлюлозосодержащих отходов (бумага, картон) (Громова, 2012). Целлюлоза в окружающей среде без ферментативного гидролиза разлагается крайне медленно, поэтому сокращение количества отходов и сведение к минимуму неблагоприятного воздействия отходов на экономику, окружающую среду и здоровье человека – одна из серьезных задач современной биотехнологии.

Разложение целлюлозы до глюкозы осуществляется посредством скоординированного действия по меньшей мере трех ферментов целлюлазного комплекса: β -1,4-эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4), β -1,4-экзоглюканазы (ЕС 3.2.1.91) и β -D-глюкозидазы (целлобиазы) (ЕС 3.2.1.21), продуцировать которые способен довольно широкий круг микроорганизмов (Jayasekara, Ratnayake, 2019).

Наиболее изученными и практически востребованными продуцентами целлюлаз являются грибы, в основном, представители родов *Trichoderma* и *Aspergillus*, благодаря более высокой, чем у бактерий, продуктивности и стабильности ферментов, а также способности мицелия к проникновению вглубь целлюлозосодержащей биомассы. Однако, в сравнении с грибами, целлюлазные системы бактерий могут обладать рядом биотехнологических преимуществ: субстратной специфичностью, термоустойчивостью, особыми оптимумами активности (Gupta et al., 2012; Franco-Cirigliano et al., 2013; Escudero-Agudelo et al., 2023).

Бактерии рода *Streptomyces* – наиболее многочисленная группа мицелиальных прокариот в почвах, где они осуществляют разнообразные химические превращения сложных субстратов, которые подчас недоступны или труднодоступны другим микроорганизмам. Гены важных для расщепления целлюлозы ферментов (Carbohydrate-Active enZymes – CAZy) – гликозилгидролазы, гликозилтрансферазы,

углевод-эстеразы и некоторые окислительно-восстановительные ферменты, обладающие вспомогательной активностью, — широко распространены среди стрептомицетов, однако практически значимые уровни целлюлолитической активности в действительности встречаются у стрептомицетов достаточно редко (Book et al., 2016). На основании данных сравнительной геномики авторы связывают это с отсутствием у большинства представителей рода *Streptomyces*, не ассоциированных с хозяевами-эукариотами, фактора транскрипции CebR, как главного регулятора катаболизма целлюлозы (Marushima et al., 2009). Геномы высокоактивных штаммов включают особую комбинацию семейств, важных для расщепления целлюлозы ферментов. Отсутствие у стрептомицетов любого из генов, кодирующих ферменты CAZy, относящиеся к семействам GH9, GH12 и GH74 (с предполагаемой активностью эндоглюканазы), GH48 (целлобиогидразы), GH10 и GH11 (ксиланазы), приводит к ограничению целлюлолитической активности штаммов (Book et al., 2016).

Традиционные стратегии генетических манипуляций со стрептомицетами для корректировки их метаболического потенциала значительно уступают по результативности тем, что уже используются на практике в отношении продуцентов грибных целлюлаз (Рожкова, Кислицин, 2021). Причины такого отставания связывают, прежде всего, с высоким содержанием гуанина (G) и цитозина (C) в геномах актиномицетов и ограниченным выбором генетических инструментов в связи со слабой рекомбинацией у стрептомицетов гомологичной ДНК (Kieser et al., 2000; Zhao et al., 2020). Многообещающим инструментом для геной инженерии стрептомицетов стала технология редактирования генома на основе системы CRISPR-Cas9 (Kormanec et al., 2019). Однако на практике, при разработке надежных процедур редактирования, еще предстоит преодолеть многочисленные технические трудности (Ye et al., 2020).

Несмотря на успехи синтетической биологии в отношении многих биотехнологически значимых микроорганизмов, целенаправленный поиск новых штаммов с более высокой активностью и уникальными свойствами продолжает сохранять свое значение, о чем свидетельствуют многочисленные работы последних лет, направленные на разработку технологий и биопрепаратов на основе целлюлолитически активных стрептомицетов (Bispo et al., 2018; Celaya-Herrera et al., 2021; Waheeb et al., 2021; Shrestha et al., 2023; Escudero-Agudelo et al., 2023). Деструктивный потенциал стрептомицетов в технологиях конверсии растительной биомассы использован далеко не в полной мере. Информация о ферментативных системах отдельных видов и обусловленных ими различиях в утилизации различных целлюлозных субстратов носит фрагментарный характер. Недостаточно исследована способность стрептомицетов колонизировать различные субстраты в качестве источника углерода.

Цель настоящей работы — оценка радиальной скорости роста и способности к деструкции различных целлюлозных субстратов у природных изолятов стрептомицетов для выявления штаммов, наиболее пригодных к использованию в технологиях переработки растительных отходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы, выделение и культивирование. Объектами исследования служили четыре природных изолята бактерий, полученные из почв разного генезиса (таблица). Выделение осуществляли с использованием селективного приема — образцы почв перед посевом прогревали при 70°C в течение 4 ч для ограничения роста немикелиальных бактерий. Для посева использовали казеин-глицериновый агар (Нетрусов и соавт., 2005). Инкубация посевов при 28°C длилась в течение двух недель.

Таблица. Происхождение и филогенетическое положение штаммов по результатам анализа фрагментов гена 16S рНК

Источник выделения	Штамм	№ доступа по базе данных NCBI	Ближайшие родственники по базе данных NCBI	Сходство, %
Подзол песчаный на древнеаллювиальных песках, Кировская обл.	Mb4-2	ON164840.1	<i>S. griseoaurantiacus</i> BQAB-05d <i>S. indiaensis</i> 1910ICU61	99.37
Выработанный торфяник низинного типа, Кировская обл.	T1-3	ON164813.1	<i>S. thermocarboxydus</i> EGI124	98.52
Серая лесная почва, Нижегородская обл.	N27-25	OR215430	<i>S. hygroscopicus</i> XM201 <i>S. geldanamycininus</i> Z374	99.82
Серая лесная почва, Нижегородская обл.	H13-3	OR215467.1	<i>S. ryensis</i> zw24	99.47

Отсев отдельных колоний производили на овсяный агар. После процедуры очистки культуры тестировали с Конго красным на минеральной среде с 1% карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) (Wood et al., 1988). Объем тестируемой выборки составил 87 изолятов. Для дальнейшей работы были отобраны штаммы Mb4-2, T1-3, N27-25 и H13-3, обеспечившие в тесте наиболее значительные (≥ 5 мм) зоны гидролиза КМЦ.

Филогенетический анализ. Таксономическое положение исследуемых штаммов определяли на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК в НПК “Синтол” (г. Москва). ДНК экстрагировали из чистых изолятов, ген 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймеров 16SF75 – AGTGGCGGACGGGTGAGTAA и 16SR1100 – TTAAGTAGCGATTCCGACTTCA. Условия для ПЦР использовали следующие: начальная денатурация при 95°C в течение 4 мин, 32 цикла при 94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с, конечная элонгация 5 мин при 68°C. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для установления процента сходства полученных нуклеотидных последовательностей с имеющимися в GenBank проводили множественные выравнивания последовательностей с помощью программы MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Полученные в работе последовательности генов 16S рРНК бактерий были депонированы в GenBank с присвоением соответствующих номеров (таблица).

ПЦР-амплификация генов целлюлазы. Для выявления генов целлюлаз у стрептомицетов проводили ПЦР с использованием двух специфичных к генам ферментов семейства GH74 праймеров, которые были сконструированы в ходе работы. Разработку праймеров начинали с поиска аминокислотных последовательностей эндоглюканаз семейства GH74 из имеющихся в базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>) для представителей рода *Streptomyces*. Затем находили соответствующие им нуклеотидные последовательности в полных геномах *Streptomyces* spp., представленных в базе GenBank Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе Clustal Omega (Sievers, Higgins, 2014) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Подбор праймеров к консервативным участкам генов ферментов семейства GH74 осуществляли вручную. Специфичность праймеров оценивали в программе BLAST Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Разработанные праймеры GH74F2 5'-GTTCGGCTGGTGGATCCAG-3' и GH74R2 5'-GTGGTACATCACGCCGATGTC-3' (размер ампликона 216 п.н.) синтезированы в НПК “Синтол” (г. Москва).

Суммарные нуклеиновые кислоты выделяли по методике (Sambrook et al., 1989). Реакционная смесь (10 мкл) содержала 1 нг ДНК, 200 мкМ dNTPs, 10 pM каждого праймера, 1× PCR-буфер и 3.75 ед. *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). ПЦР проводили на программируемом термостате ТП4-ПЦР-01 Терцик (НПО “ДНК-Технология”, Россия) при следующем режиме: 1 цикл 95°C – 5 мин, 35 циклов по 95°C – 30 с, 72°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с, 1 цикл 72°C – 8 мин. Продукты реакции разделяли методом вертикального электрофореза в 7.0% полиакриламидном геле, который окрашивали бромистым этидием (Sambrook et al., 1989). Визуализацию результатов электрофореза проводили с помощью трансиллюминатора Квант-312 (“Helicon”, Россия). Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, полученных в ходе амплификации с праймерами GH74F2 и GH74R2, выполнено в НПК “Синтол” (г. Москва). Биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили в два этапа: 1) автоматический с использованием сервиса BLAST на сайте NCBI; 2) попарные выравнивания в программе Clustal Omega с исходными аминокислотными последовательностями, использованными для дизайна праймеров, после их обратной трансляции *in silico* (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_backtranseq). Процент сходства рассчитывали на сайте <https://molbiol.kirov.ru/>.

Эксперименты по деструкции целлюлозных субстратов. Для разных вариантов опыта в агаризованную среду Гетчинсона вносили в качестве единственного источника углерода (10 г/л): КМЦ, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ), а также природные целлюлозосодержащие материалы – солому, опил березы и опил дуба, которые предварительно размалывали до состояния порошка. Микроорганизмы засевали на чашку уколом в трехкратной повторности, в каждом варианте использовали по три чашки. Инкубировали посевы при 28°C в течение 14 сут. Затем поверхность заливали 0.1% водным раствором Конго красного, экспонировали 15 мин при комнатной температуре, раствор сливали и поверхность промывали 1М раствором NaCl в течение 10 мин. О продукции целлюлаз на различных субстратах судили по величине обесцвеченной зоны вокруг колонии тестируемого штамма, поскольку продукты разрушения целлюлозы не окрашиваются красителем (Wood et al., 1988).

Определение радиальной скорости роста. Для измерения радиальной скорости роста (Кг) культуры стрептомицетов засевали на агаризованную среду Гетчинсона с каждым из модельных целлюлозных субстратов таким же образом, как описано выше – по 9 уколов для каждого штамма. В контроле производили посев штаммов на минеральный агар Гаузе 1, источник углерода в котором представлен крахмалом (20 г/л) (Гаузе и соавт., 1983). Чашки с посевами инкубировали при 28°C. Измерение

диаметров колоний проводили через 48, 96, 120, 168, 216 и 336 ч от начала культивирования. За диаметр отдельной колонии в данный момент времени принимали среднее арифметическое 9 измерений. Радиальную скорость роста определяли по формуле:

$$K_r = (d_2 - d_1)/(t_2 - t_1),$$

где d_1 и d_2 — диаметр колоний (мкм) в начальный (t_1) и конечный (t_2) моменты времени измерения соответственно (ч) (Билай, 1973).

Определение активности целлюлаз при разложении соломы. Культуры выращивали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 2; NH_4Cl — 2, $NaCl$ — 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1; $MnSO_4$ — 0.05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.05; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.1. В качестве единственного источника углерода в среду вносили измельченную солому в количестве 10 г/л. Культивирование осуществляли в стационарных условиях при 28°C в течение 6 сут. Для определения целлюлазной активности мицелий осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 10 мин. Для анализа использовали надосадочную жидкость. Активность фермента измеряли при 50°C и pH 5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров, концентрацию которых определяли спектрофотометрически при 540 нм с реагентом на основе 3,5-динитросалициловой кислоты согласно методике (Ghose, 1987). За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на субстрат в условиях ферментативной реакции за 1 ч образуется 1 мкмоль редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозный эквивалент. Все измерения проводили в трех повторностях, погрешность измерений не превышала 5%.

Статистическая обработка результатов и построение графиков выполнены с использованием программ Microsoft Excel и Statgraphics. Результаты определения способности стрептомицетов к деградации различных целлюлозных субстратов были кластеризованы и представлены в виде тепловой карты с помощью веб-сервиса NGCHM-web-builder (Ryan et al., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная идентификация штаммов-целлюлолитиков, основанная на анализе фрагмента гена 16S рРНК, подтвердила, что выделенные штаммы Mb4-2, T1-3, N27-25 и H13-3 являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Kitasatosporales*, класса *Actinomycetes*. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с другими представленными в NCBI последовательностями позволило

с высокой долей вероятности (уровень сходства составил более 98.5%) заключить, что изучаемые микроорганизмы являются ближайшими генетическими родственниками видов *S. griseoaurantiacus*/*S. indiaensis* (Mb4-2), *S. thermocarboxydus* (T1-3) *S. hygrosopicus*/*S. geldanamycininus* (N27-25) и “*S. ryensis*” (H13-3) (таблица). Осторожность в интерпретации результатов в отношении видов рода *Streptomyces* обусловлена тем, что сходство генов 16S рРНК не всегда гарантирует достаточно высокий уровень родственности бактериальных геномов, и в большинстве случаев для видовой идентификации стрептомицетов необходим мультилокусный или полногеномный анализ (Komaki, 2023).

В образцах ДНК всех выделенных по способности к гидролизу КМЦ штаммов в ходе ПЦР-амплификации с праймерами GH74F2/ GH74R2 был выявлен целевой ампликон — 216 п.н. Для проверки идентичности амплифицированных фрагментов генам целлюлаз ПЦР-продукты исследуемых штаммов подвергли секвенированию. Сервисом BLAST установлено сходство (87.6–98.2%) полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями полных геномов *Streptomyces* spp. В связи с тем, что данные полных геномов не дают информации о конкретном гене, полученные последовательности ПЦР-продуктов стрептомицетов попарно выравнивали с исходными аминокислотными последовательностями, использованными для дизайна праймеров, после их обратной трансляции *in silico*. Процент сходства с последовательностями гликозид-гидролаз семейства GH74 изменялся от 57.9 до 78.0% в зависимости от штамма. Наиболее высокое (78.0%) сходство ПЦР-продукта с последовательностью β-1,4-эндоглюканазы *S. viridosporus* T7A (регистрационный номер QEU87985.1 в GenBank), принадлежащей к семейству GH74, установлено для штамма “*S. ryensis*” H13-3. Последовательности ампликонов, полученные для штаммов *S. griseoaurantiacus* Mb4-2 и *S. thermocarboxydus* T1-3, совпадали с последовательностью β-1,4-эндоглюканазы *S. pristinaespiralis* (ALC25053.1) на 61.4 и 59.9% соответственно. ПЦР-продукт штамма *S. hygrosopicus* N27-25 был гомологичен целевому ферменту *S. glaucescens* (QEU68415.1) только на 57.9%. Невысокий уровень выявленного сходства может быть обусловлен как наличием генного полиморфизма исследуемых ферментов, так и пока ограниченным количеством представленных в GenBank данных (López-Mondéjar et al., 2016). Тем не менее результаты указывают на наличие у исследуемых культур генов, кодирующих синтез 1,4-β-эндоглюканаз, относимых по международной классификации ферментов к семейству GH74.

Эндо-1,4-глюканазы (ЕС 3.2.1.4) катализируют гидролиз 1,4-β-D-гликозидных связей в различных β-глюканах, что является одним из необходимых условий процесса конверсии растительной биомассы.

В целлюлозе при этом гидролизу подвергаются преимущественно ее аморфные области, однако известны эндоглюканазы, способные разлагать кристаллическую целлюлозу (Cecchini et al., 2018).

Стрептомицеты характеризуются неодинаковой способностью к утилизации различных источников углерода. Чтобы выяснить возможность деструкции тех или иных целлюлозосодержащих субстратов новыми изолятами, их высевали на синтетические среды, содержащие в качестве единственного источника углерода КМЦ, МКЦ, а также природные целлюлозосодержащие материалы – солому, опил березы и опил дуба. Результаты определения в тесте с Конго красным величины зон их деструкции различными штаммами представлены в виде тепловой карты (рис. 1).

Столбцы обозначают различные источники целлюлозы, а строки – исследуемые штаммы. Наибольшей активностью деструкции модельных целлюлозных субстратов, судя по величине зон гидролиза, характеризовался *S. thermocarboxydus* T1-3. Так, обесцвеченные зоны гидролиза МКЦ и КМЦ составили у этого штамма 51 ± 3 и 48 ± 2 мм соответственно, т.е. существенно превысили зоны гидролиза КМЦ, образуемые лучшими целлюлолитическими изолятами стрептомицетов из почв Египта – 25 мм (Waheeb et al., 2021) и соляных лагун Мексики – от 30 мм (Escudero-Agudelo et al., 2023). Кластеризация полученных данных автоматизированным алгоритмом выделила штамм *S. thermocarboxydus* T1-3 в отдельный кластер А, объединив в кластер Б три другие культуры *S. griseoaurantiacus* Mb4-2, *S. hygrosopicus* N27-25 и «*S. ryensis*» H13-3, менее эффективно разлагающие как кристаллические формы целлюлозы, так и природные целлюлозосодержащие субстраты. Между собой штаммы кластера Б различались, в основном, по способности к деструкции дубового опила и КМЦ.

При построении тепловой карты были сгруппированы по доступности для микробного разложения также сами модельные субстраты. В кластер I вошли природные целлюлозосодержащие материалы, доступность которых снижалась в ряду: солома–березовый опил–дубовый опил (рис. 1). Второй кластер (II) объединил субстраты, представляющие собой кристаллические формы целлюлозы.

Величина зон гидролиза МКЦ (35–41 мм) и КМЦ (19–48 мм) почти у всех изолятов существенно превышала величину зон гидролиза природных целлюлозных материалов (12–25 мм). Только у штамма *S. hygrosopicus* N27-25 способность разлагать КМЦ (20 ± 3 мм), солому (17 ± 1 мм) и опил березы (19 ± 1 мм) существенно не различалась.

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа полученных данных было установлено, что на варьирование величины зоны гидролиза фактор «субстрат» ($F = 76.06$; $p \leq 0.05$) оказал втрое большее влияние, чем фактор «штамм» ($F = 25.62$; $p \leq 0.05$). Варьирование показателя, обусловленное взаимодействием факторов «штамм» $\times$ «субстрат» ($F = 24.28$; $p \leq 0.05$), оказалось близким по силе к влиянию самого фактора «штамм». Известно, что целлюлаза представляет собой многокомпонентную ферментную систему, синтез отдельных компонентов которой индуцируется используемым субстратом (Rajagopal, Kannan, 2017). Различия исследуемых штаммов по способности утилизировать модельные целлюлозные субстраты, очевидно, обусловлены особенностями состава их ферментного комплекса.

Процесс разложения целлюлозной массы тесно связан с колонизацией субстрата микроорганизмами-деструкторами. Мицелиальное строение стрептомицетов позволяет им с успехом распространяться на поверхности и проникать внутрь субстратов. Радиальную скорость роста (K_r) каждого изолята оценивали путем периодического

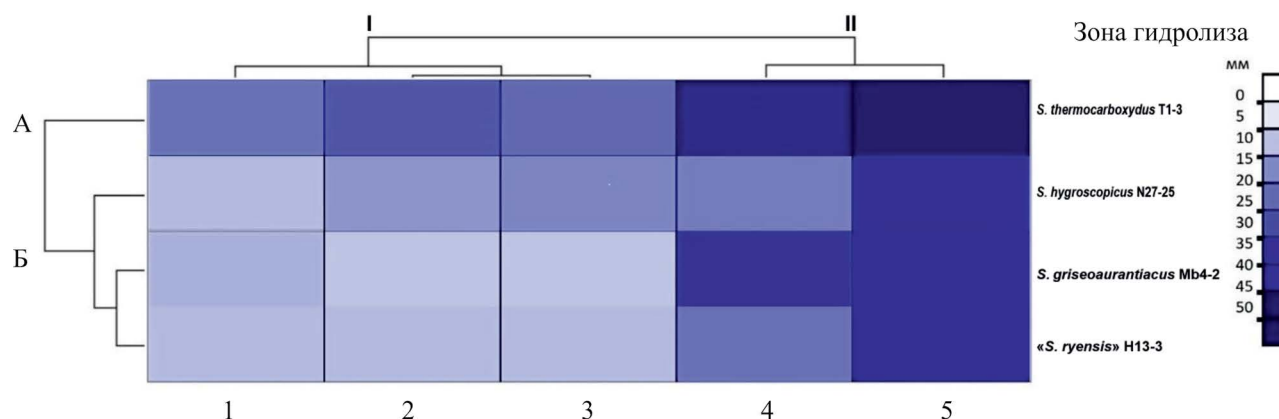


Рис. 1. Тепловая карта, отражающая различия в величине зон гидролиза стрептомицетами целлюлозы в составе различных субстратов: 1 – опил дуба; 2 – солома; 3 – опил березы; 4 – КМЦ; 5 – МКЦ.

замера диаметра колоний, растущих в чашках Петри на средах с модельными целлюлозными субстратами в качестве единственного источника углерода. K_r определяли за определенный промежуток времени. На рис. 2 приведены зависимости значений K_r от времени роста на модельных источниках углерода. Рост культур на целлюлозосодержащих средах начинался на 2–3 сут позже, чем на контрольной среде с крахмалом.

Динамика роста стрептомицетов на разных средах при одинаковых условиях инкубации была неодинакова. Так, *S. thermocarboxydus* T1-3 развивался на всех модельных источниках целлюлозы с высокой скоростью, близкой к росту на среде с крахмалом (63 ± 6 мкм/ч), за исключением среды с МКЦ ($K_r = 29 \pm 13$ мкм/ч) (рис. 3).

Наиболее быстрым ростом в течение всего времени экспозиции ($K_r = 87 \pm 3$ мкм/ч) штамм характеризовался на среде с соломой. На всех средах, содержащих природные растительные материалы, до 168 ч экспозиции K_r была примерно одинакова, затем на средах с древесным опилом, как и на среде с КМЦ, постепенно снижалась (рис. 2).

S. griseoaurantiacus Mb4-2 рос на всех источниках углерода, включая крахмал, с одинаково невысокой скоростью (K_r от 31 ± 1 до 43 ± 7 мкм/ч). Продолжительность фазы логарифмического роста у этой культуры варьировала от 48 и 96 ч на средах

с соломой и древесным опилом до 168 ч на средах с КМЦ и МКЦ. В промежутке 216–336 ч для этого штамма отмечена вторая лог-фаза, наиболее интенсивная на среде с дубовым опилом ($K_r = 67 \pm 16$ мкм/ч).

S. hygroscopicus N27-25 тоже рос с 7-суточной периодичностью при культивировании на средах с природными растительными материалами. На среде с КМЦ рост этой культуры проявился только в самом конце экспозиции (216–336 ч), K_r составляла 29 ± 4 мкм/ч.

Рост “*S. ryensis*” H13-3 наблюдали на средах со всеми модельными источниками углерода, кроме дубового опила, что можно объяснить как чувствительностью штамма к танинам (Scalbert, 1991), так и отсутствием соответствующих субстрат-специфичных ферментов. Наиболее высокая скорость роста выявлена на средах с соломой ($K_r = 50 \pm 2$ мкм/ч) и опилом березы ($K_r = 55 \pm 5$ мкм/ч) (рис. 3).

На варьирование параметра K_r , как показали результаты двухфакторного дисперсионного анализа, существенное влияние оказывали оба фактора – “штамм” ($F = 934$; $p \leq 0.05$) и “субстрат” ($F = 383$; $p \leq 0.05$), а также взаимодействие факторов “субстрат” $\times$ “штамм” ($F = 83$; $p \leq 0.05$). При этом варьирование величины K_r , обусловленное фактором “штамм”, более чем в два раза превышало варьирование, обусловленное фактором “субстрат”, и на

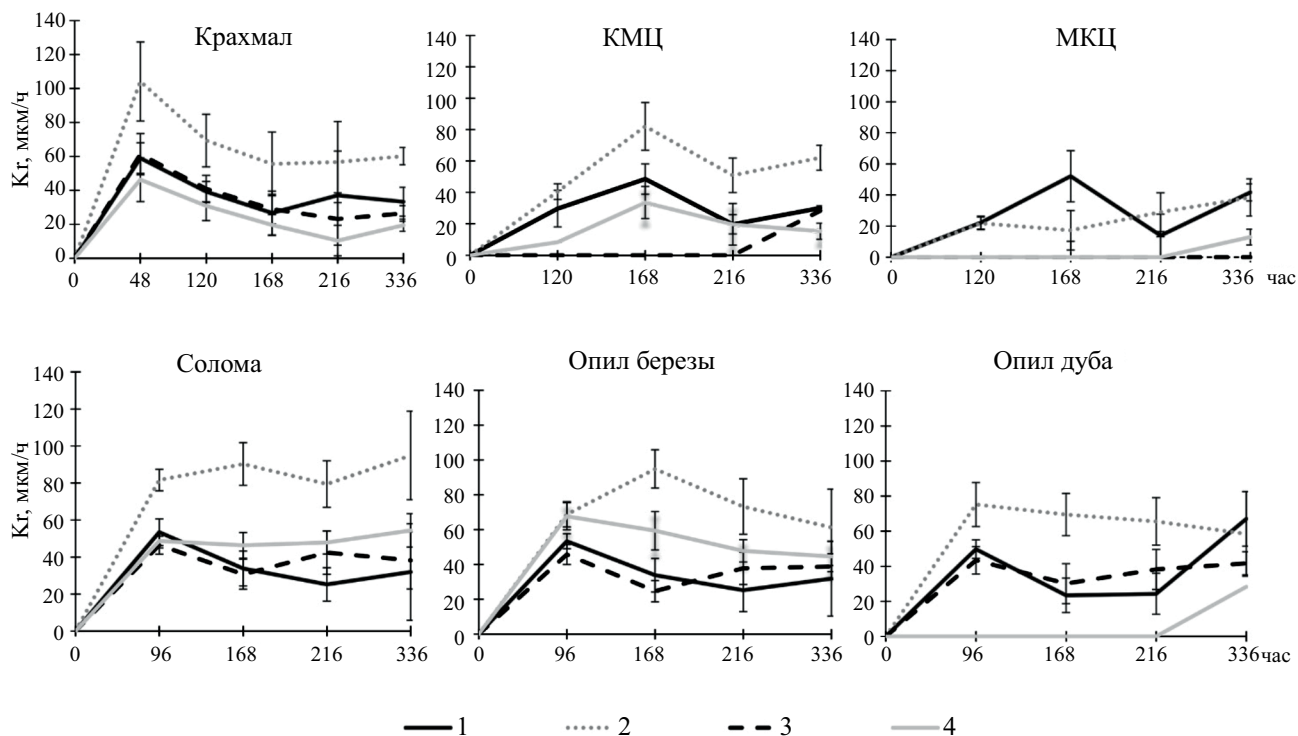


Рис. 2. Динамика скорости радиального роста на средах с различными источниками углерода штаммов: 1 – *S. griseoaurantiacus* Mb4-2; 2 – *S. thermocarboxydus* T1-3; 3 – *S. hygroscopicus* N27-25; 4 – “*S. ryensis*” H13-3.

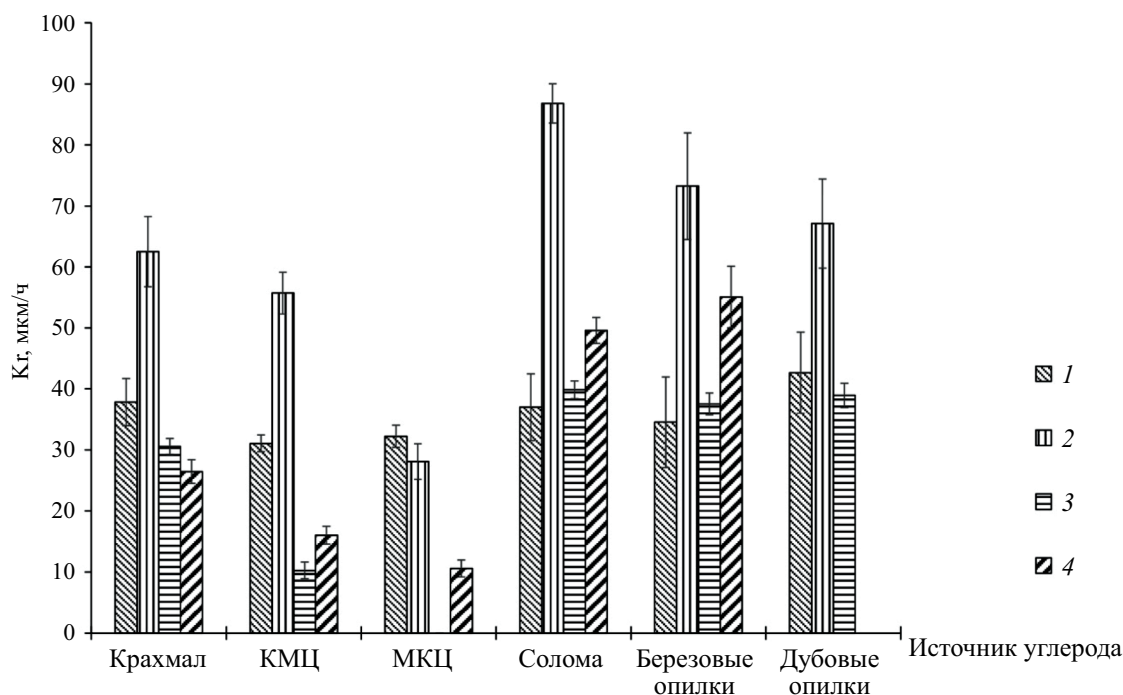


Рис. 3. Скорость радиального роста на различных субстратах штаммов: 1 – *S. griseoaurantiacus* Mb4-2; 2 – *S. thermocarboxydis* T1-3; 3 – *S. hygrosopicus* N27-25; 4 – "*S. ryensis*" N13-3 (среднее за 14 сут).

порядок – изменчивость, обусловленную взаимодействием этих факторов. Главенствующую роль штамма в скорости заселения субстрата необходимо учитывать при выявлении культур стрептомицетов, пригодных для деструкции целлюлозосодержащих материалов.

Сопоставление данных по радиальной скорости роста с результатами определения целлюлазной активности стрептомицетов на средах с различными источниками углерода, вопреки ожиданию, не выявило строгого соответствия между этими параметрами ни для одной из культур. Если зоны деструкции природных растительных субстратов в тесте с Конго красным и диаметры колоний совпадали по величине, или расхождение составляло не более 1–2 мм, то в отношении КМЦ и МКЦ такое соответствие прослеживалось не всегда. Величина колоний, образуемых штаммами N27-25 и N13-3, значительно уступала величине зон ферментативного гидролиза. Согласно литературным данным, регуляция размера колоний связана у стрептомицетов с феноменом программируемой клеточной смерти (ПКС), происходит в соответствии с доступностью источников углерода и тем самым способствует установлению оптимального соотношения размеров колонии с реальным запасом ресурсов среды (Филиппова, Виноградова, 2017). Согласно этим представлениям, все исследуемые штаммы хорошо метаболизируют растительные субстраты, поскольку зоны деструкции целлюлозы и колонизации пространства

по величине совпадают, и гораздо хуже – кристаллическую целлюлозу, о чем свидетельствуют не только меньшие значения радиальной скорости роста, но и перекрывание у штаммов N27-25 и N13-3 размеров колоний зонами деструкции целлюлозы.

Оценка связи между целлюлазной активностью и средней скоростью радиального роста стрептомицетов с помощью корреляционного анализа выявила слабую, но достоверную обратную зависимость ($r = -0.22$, $p \leq 0.05$) между этими показателями. Возможно, у некоторых стрептомицетов недостаточная активность целлюлазного комплекса отчасти компенсируется скоростью их расселения в пространстве для поиска более доступных источников углерода.

Определение целлюлазной активности по количеству редуцирующих сахаров с ДНС-реагентом проводили при выращивании стрептомицетов в жидкой среде с соломой в качестве единственного источника углерода. Результаты позволили ранжировать исследуемые штаммы в порядке возрастания активности фермента: *S. hygrosopicus* N27-25 (63.00 ± 9.45 Ед/мл) < *S. griseoaurantiacus* Mb4-2 (124.38 ± 18.67 Ед/мл) < "*S. ryensis*" N13-3 (149.38 ± 10.52 Ед/мл) < *S. thermocarboxydis* T1-3 (171.25 ± 8.13 Ед/мл). Продолжительность ферментации соломы до момента достижения максимальной активности целлюлазы у этих штаммов составила 96, 48, 24 и 24 ч соответственно. Особый интерес представляет *S. thermocarboxydis* T1-3, продемонстрировавший максимальную активность

уже через 24 ч ферментации соломы. Хотя сравнение наших результатов с данными, известными из литературы, затруднено из-за различий в условиях определения активности и синтеза фермента, все же отметим, что исследуемые изоляты обладают достаточно высокой специфической ферментативной активностью по сравнению с другими целлюлолитическими представителями рода *Streptomyces*. Например, в предыдущих исследованиях при росте штамма *Streptomyces* sp. F262 на среде с измельченной пшеничной соломой (1.2%) и добавлением дрожжевого экстракта максимальная активность эндоглюконазы наблюдалась только после 7-дневной ферментации и составила 1.73 Ед/мл (Tuncer et al., 2004). В другой работе оценка способности *S. thermocarboxydus* использовать для синтеза ферментов восемь различных видов агроотходов в погруженной культуре выявила максимальную активность целлюлазы только через 72 и 96 ч ферментации при росте штамма на кожуре граната (1.07 Ед/мл) и апельсина (5.53 Ед/мл) соответственно (Shrestha et al., 2023). Эндоглюконазная активность штамма *Streptomyces* sp. STCH565-A в жидкой среде с КМЦ и добавлением глюкозы изменялась от 0.15 до 0.27 Ед/мл, начиная с 4-х сут роста (Escudero-Agudelo et al., 2023). Результаты, сопоставимые по величине активности фермента с нашими, были получены для штамма *S. diastaticus* PA-01 на 4-е сут ферментации кукурузного жмыха (154.45 Ед/мл) и на 5-е сут ферментации жома сахарного тростника (148.11 Ед/мл). Но максимальную активность (1180.3 Ед/мл) этот штамм проявил после 5-сут ферментации на среде и в условиях, оптимизированных с помощью метода поверхности отклика в многофакторном эксперименте (Bisro et al., 2018). Все другие приведенные значения ферментативной активности получены авторами в условиях без проведения процедуры их оптимизации.

Таким образом, наилучшим кандидатом для использования в качестве деструктора растительных отходов стал штамм *S. thermocarboxydus* T1-3, отличающийся наиболее активным ферментативным гидролизом всех модельных источников целлюлозы, высокой радиальной скоростью роста на большинстве субстратов, максимальной активностью целлюлазы, достигаемой при ферментации соломы за рекордно короткое время.

Использование несложных, но эффективных методик по обнаружению и оценке целлюлазной активности у новых штаммов актиномицетов позволит шире использовать их потенциал для нужд биотехнологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания ФГБНУ “Федеральный аграрный научный центр

Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого” (тема № FNWE-2022-0005).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. М.: Рипол Классик, 1973. 240 с.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
- Громова Н.Ю. Теоретические аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих отходов // Известия Международной академии аграрного образования. 2012. Т. 1. С. 8–12.
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Динариева Т.Ю. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Рожкова А.М., Кислицин В.Ю. Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61. С. 253–294.
- Филиппова С.Н., Виноградова К.А. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференцировки стрептомицетов // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 421–438.
<https://doi.org/10.7868/S0026365617040073>
- Filippova S.N., Vinogradova K.A. Programmed cell death as one of the stages of streptomycete differentiation // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 439–454.
- Bispo A.S.R., Andrade J.P., Souza D.T., Teles Z.N.S., Nascimento R.P. Utilization of agroindustrial by-products as substrate in endoglucanase production by *Streptomyces diastaticus* PA-01 under submerged fermentation // Braz. J. Chem. Eng. 2018. V. 35. P. 429–440.
<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160415>
- Book A.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Takasuka T.E., Wendt-Pienkowski E., Doering D.T., Suh S., Raffa K.F., Fox B.G., Currie C.R. Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinate gene expression // PLoS Biol. 2016. V. 14. № 6. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002475>
- Cecchini D.A., Pepe O., Pennacchio A., Fagnano M., Faraco V. Directed evolution of the bacterial

- endo- β -1,4-glucanase from *Streptomyces* sp. G12 towards improved catalysts for lignocellulose conversion // *Amb. Express*. 2018. V. 8. Art. 74. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0602-7>
- Celaya-Herrera S., Casados-Vázquez L. E., Valdez-Vázquez I., Barona-Gómez F., Bideshi D.K., Barboza-Corona J. E. A cellulolytic *Streptomyces* sp. isolated from a highly oligotrophic niche shows potential for hydrolyzing agricultural wastes // *Bioenerg. Res*. 2021. V. 14. P. 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>
- Escudero-Agudelo J., Martínez-Villalobos J., Arocha-Garza H., Galán-Wong L.J., Avilés-Arnaut H., De la Torre-Zavala S. Systematic bioprospection for cellulolytic actinomycetes in the Chihuahuan Desert: isolation and enzymatic profiling // *Peer J*. 2023. V. 11. Art. e16119. <https://doi.org/10.7717/peerj.16119>
- Franco-Cirigliano M. N., de Carvalho-Rezende R., Gravina-Oliveira M. P., Pereira P.H. F., Do Nascimento R.P., Bon E.P. D. S., Macrae A., Coelho R.R. R. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates // *Biomed. Res. Int*. 2013. V. 2013. Art. 584207. <https://doi.org/10.1155/2013/584207>
- Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // *Pure & Appl. Chem*. 1987. V. 59. P. 257–268.
- Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // *Int. J. Microbiol*. 2012. V. 2012. Art. 578925. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Jayasekara S., Ratnayake R. Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*. IntechOpen. 2019. 130 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation; Norwich, UK: 2000. 620 p.
- Komaki H. Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces* // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>
- Kormanec J., Rezuchova B., Homerova D., Csolleiova D., Sevcikova B., Novakova R., Feckova L. Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2019. V. 103. P. 5463–5482. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09901-0>
- López-Mondéjar R., Zühlke D., Becher D., Riedel K., Baldrian P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems // *Sci. Rep*. 2016. V. 6. Art. 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- Marushima K., Ohnishi Y., Horinouchi S. CebR as a master regulator for cellulose/cellooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus* // *J. Bacteriol*. 2009. V. 191. P. 5930–5940. <https://doi.org/10.1128/jb.00703-09>
- Rajagopal G., Kannan S. Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15 // *Biotechnol. Rep*. 2017. V. 13. P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.003>
- Ryan M.C., Stucky M., Wakefield C., Melott J.M., Akbani R., Weinstein J.N., Broom B.M. Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps // *F1000Research*. 2019. V. 8. P. 1–17. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>
- Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. 545 p. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins // *Phytochemistry*. 1991. V. 30. P. 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Shrestha S., Khatiwada J.R., Kognou A.L.M., Chio C., Qin W. Biomass-degrading enzyme(s) production and biomass degradation by a novel *Streptomyces thermocarboxydus* // *Curr. Microbiol*. 2023. V. 80. Art. 71. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03174-z>
- Sievers F., Higgins D.G. Clustal omega // *Curr. Prot. Bioinform*. 2014. V. 48. P. 3.13.1–3.13.16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol*. 2021. V. 38. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Waheeb M.S., Elkhatib W.F., Yassien M.A., Hassouna N.A. Production of cellulase by soil isolated *Streptomyces* sp. // *Arch. Pharm. Sci. ASU*. 2021. V. 5. P. 225–233.
- Wood P.J., Erfle J.D., Teather R.M. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases // *Methods Enzymol*. 1988. V. 160. P. 59–74.
- Ye S., Enghiad B., Zhao H., Takano E. Fine-tuning the regulation of Cas9 expression levels for efficient CRISPR-Cas9 mediated recombination in *Streptomyces* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2020. V. 47. P. 413–423.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Cellulolytic Potential of New Strains of Soil Streptomyces**N. A. Bokov^{1, 2, *}, A.V. Bakulina¹, E. A. Bessolitsyna¹, I. G. Shirokikh^{1, 2}**¹*Federal Agricultural Scientific Center of the North-East named N.V.Rudnitsky, Kirov, 610007, Russia*²*Vyatka State University, Kirov, 610000, Russia*^{*}*e-mail: nikita-bokov@mail.ru*

Abstract. In order to obtain new strains of cellulolytic microorganisms for use in technologies for processing plant and other cellulose-containing waste, four new bacterial strains of the genus *Streptomyces* have been isolated from various sources. In tests with Congo red, the isolates' ability to degrade carboxymethylcellulose (CMC), microcrystalline cellulose (MCC) and natural cellulose-containing materials – straw, birch and oak sawdust was determined. The activity of cellulase was quantified during fermentation of straw. On media with each of the model carbon sources, the radial growth rate was determined as an indicator characterizing the ability of isolates to colonize various substrates. The conjugate characteristic of cellulase activity and radial growth rate on substrates of various natures made it possible to assess the prospects for further use of the studied strains as destructors of cellulose-containing waste. The strain *Streptomyces thermocarboxydus* T1-3 was the leader in the studied sample, characterized by the most active enzymatic hydrolysis of all model cellulose sources, a high radial growth rate (up to 87 ± 3 microns/hour), and the achievement of maximum cellulase activity (171.25 ± 8.13 U/ml) during straw fermentation within 24 hours.

Keywords: cellulose, *Streptomyces*, destruction, endoxyloglucanases, substrate colonization, radial growth rate