

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗЛАГАЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Галкиной Екатерины Владиславовны

Научный руководитель

доцент кафедры микробиологии

и физиологии растений, к.б.н., доцент

_____ Е. В. Глинская

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор

_____ С. А. Степанов

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Целлюлоза является главной составной частью растительного покрова Земли. Это полимер, состоящий из цепочек молекул β - D - глюкозы, соединенных β - 1,4 - гликозидными связями. Ее синтез по своим масштабам превосходит синтез всех остальных природных соединений, так что (наряду с крахмалом) целлюлоза - самое распространенное на Земле органическое соединение.

В то же время, химическое строение целлюлозы таково, что делает ее материалом, инертным ко многим воздействиям [1]. Тем не менее, в природе происходит эффективная деструкция целлюлозы за счет деятельности грибов и прокариот, которые участвуют, таким образом, в минерализации органического вещества и глобальном цикле углерода. При этом доступность кислорода, по всей видимости, играет одну из ключевых ролей в стратегии разложения целлюлозы микроорганизмами. В аэробных условиях значительная роль в этом процессе принадлежит грибам, хотя среди аэробных бактерий также есть целлюлолитические представители. Аэробные целлюлолитики характеризуются высокой скоростью роста и наличием неассоциированных целлюлазных систем [2]. В анаэробных условиях целлюлозу расщепляют, как правило, бактерии, которые синтезируют мультидоменные гидролитические ферменты, связанные с клетками, либо надмолекулярные комплексы - целлюлосомы. В то же время открытым остается вопрос о способности факультативно - анаэробных микроорганизмов разлагать целлюлозу, поскольку за исключением нескольких мезофильных бактерий - *Cellulomonas terrae*, *Telmatobacter bradas* - для абсолютного большинства представителей этой группы рост на целлюлозе не показан [3].

Микробиологическая конверсия возобновляемых ресурсов биосферы в различные полезные продукты в настоящее время представляет собой одну из важнейших проблем, чем и определяется неослабевающий интерес к

целлюлозоразлагающим микроорганизмам. Основная проблема, связанная с утилизацией лигноцеллюлозных отходов, состоит в том, что целлюлоза очень устойчива к различным воздействиям. Поэтому ежегодно в различных лабораториях мира исследуются штаммы микроорганизмов с целью изыскания новых, с более высоким уровнем биосинтеза целлюлаз, а также разрабатываются биотехнологические способы использования целлюлозы и, в первую очередь, целлюлозосодержащих отходов растениеводства.

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлось изучение биологических особенностей целлюлозоразлагающих микроорганизмов.

Для решения поставленной цели были определены следующие задачи.

1. Определить видовое разнообразие целлюлозоразлагающих бактерий, обитающих в лесной подстилке лесопарка «Кумысная поляна».
2. Выявить видовой состав бактерий, присутствующих в кишечнике личинок почвенных насекомых.
3. Изучить морфологические, культуральные и биохимические признаки целлюлозоразлагающих бактерий.

Материал и методы исследования. Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского в период с 2016 по 2017 гг.

Материалом для исследования служили 8 проб почв из лесной подстилки, 10 личинок цикады горной (*Cicadetta montana* Scopoli, 1772) и 10 личинок бронзовки золотистой (*Cetonia aurata* Linnaeus, 1758), собранные в весенне - летний период 2016 года на территории лесопарка «Кумысная поляна» (г. Саратов).

Определение систематического положения насекомых проводили по определителю насекомых [4].

Микробиологические исследования осуществляли стандартными методами. Готовили ряд последовательных разведений почвенной суспензии до показателя 10^{-6} . По 0,1 мл суспензии высевали на ГРМ - агар. Посевы инкубировали при температуре 28 °С. Затем проводили количественный учёт выделенных штаммов микроорганизмов и отсеивали их на плотную среду Гетчинсона - Клейтона на способность к расщеплению целлюлозы, в состав среды входили: KH_2PO_4 - 1,0, MgSO_4 - 0,5, FeSO_4 - 0,01; NaNO_3 - 2,5, карбоксиметилцеллюлоза - 10, агар - 20, H_2O - 1 л [5].

Параллельно проводили посев отобранных образцов в жидкую среду Гетчинсона - Клейтона. Посевы инкубировали при температуре 28°С в течение 48 - 96 ч.

Непосредственно перед бактериологическим посевом насекомых усыпляли, обрабатывали в 70% - ном этаноле в течение пяти минут для уничтожения микроорганизмов, обитающих на внешних покровах, затем промывали в стерильном физиологическом растворе. У 40 экземпляров личинок, обработанных таким образом, брали кишечник, растирали в ступке с 9 мл H_2O (разведение 1:10). По 0,1 мл полученной суспензии высевали в жидкую среду Гетчинсона - Клейтона и на ГРМ - агар. Посевы инкубировали при температуре 28°С в течение 48 - 96 часов. После, культуры, выращенные на агаре, пересеивали на плотную среду Гетчинсона - Клейтона. Посевы инкубировали при той же температуре в течение 96 часов.

Затем проводили количественный учёт выделенных штаммов микроорганизмов и отсеивали их на скошенные питательные среды для дальнейшего изучения.

Морфологические и культуральные признаки изучали как на первичных посевах, так и на полученных чистых культурах.

В ходе исследований нами были изучены некоторые биологические свойства микроорганизмов, такие как: способность штаммов к использованию различных сахаров (глюкоза, сахароза, маннит, лактоза, ксилоза, арабиноза, мальтоза, сорбит), цитрата, способность к гидролизу

крахмала, желатина, продукции сероводорода, аммиака. При изучении ферментативной активности определяли наличие у выделенных штаммов каталазы и оксидазы.

Так же проводилась работа по определению устойчивости выделенных штаммов к абиотическим факторам. Нами была изучена способность штаммов к росту при различных показателях рН среды (5, 6, 9, 10), концентрациях NaCl в среде (2 - 15 %), действию температурного фактора (+10 и +45°C).

Индекс встречаемости рассчитывали как число проб, в которых обнаружены бактерии данного вида, к общему числу проб, выраженное в процентах [6].

Идентификацию выделенных штаммов проводили по Определителю бактерий Берджи [7].

Структура и объем работы. Работа изложена на 42 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 рисунками и 7 таблицами. Список использованных источников 39 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о химическом строении целлюлозы и ее свойствах, о целлюлозоразлагающих микроорганизмах и ферментах, гидролизующих целлюлозу.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о биологических особенностях целлюлозоразлагающих микроорганизмов в лесной подстилке и кишечнике почвенных насекомых.

Было выделено 9 видов, относящихся к 5 родам целлюлозоразлагающих микроорганизмов.

Количественные показатели микроорганизмов в почве на территории лесопарка «Кумысная поляна» варьировали от 10^6 до 10^8 КОЕ в 1 г. Максимальная численность наблюдалась для *Bacillus subtilis*, *Micrococcus agilis* и *Kingella denitrificans*.

Индекс встречаемости изолированных штаммов находился в пределах 12,5 - 37,5%. Максимальный индекс встречаемости выявлен для *Kingella denitrificans*.

Среди бактерий, выделенных из почвы лесопарка «Кумысная поляна», встречались разные морфологические формы, наибольший процент составили грамотрицательные палочки.

Для микроорганизмов, выделенных из кишечника личинок насекомых, индекс встречаемости находился в пределах 40 - 80%. Максимальный индекс встречаемости выявлен для *Kingella denitrificans* и *Bacillus subtilis*.

Максимальные количественные показания изолированных бактерий достигали 10^8 КОЕ.

Бактерии, выделенные из кишечника личинок насекомых, обитающих в почве, представлены грамположительными и грамотрицательными палочками в равном процентном соотношении.

При проведении биохимических тестов было выявлено, что все обладали каталазной активностью. 50 % микроорганизмов, выделенных из почвы, проявили способность к редукции нитратов. Рост в анаэробных условиях незначительный.

Так же были проведены исследования сахаролитических свойств. Анализ полученных данных показал, что большинство микроорганизмов способны расщеплять ксилосу и маннозу. В то время, как наименее востребованными углеводами оказались сахароза и лактоза.

Так же был изучен диапазон устойчивости микроорганизмов к некоторым физико-химическим факторам.

Выявлено, что щелочное и слабо-щелочное значение pH предпочитают 100% изолированных видов.

Наличие 15% NaCl в среде стало летальным для 100% исследуемых штаммов.

При изучении биохимической активности микроорганизмов, выделенных из кишечника почвенных насекомых мы увидели, что способностью к редукции нитратов и гидролизу желатина и крахмала обладают 100% изолированных штаммов.

Исследование сахаролитических свойств показало, что расщеплять углеводы могут лишь 25% всех выделенных штаммов.

При постановке тестов на устойчивость микроорганизмов к физико-химическим факторам установлено, что все изолированные штаммы способны к росту при 10 °С, рост при 45 °С отсутствовал.

Наличие 10 % NaCl в среде стало летальным для 100% исследуемых штаммов. А так же нужно отметить, что большинство способны к росту при широком диапазоне рН.

Таким образом, наши исследования показали, что организм личинок почвенных насекомых и лесная подстилка является средой обитания для широкого круга целлюлозоразлагающих микроорганизмов. Почва обладает всеми необходимыми условиями для обитания данных микроорганизмов.

Насекомое обеспечивает этих бактерий пищевым субстратом, сглаживает негативное влияние факторов внешней среды. Бактерии, в свою очередь, участвуют в решении ряда физиологических проблем организма хозяина, связанных с питанием растительным органическим детритом.

Выводы

1. В состав микробоценоза лесной подстилки входят 8 видов бактерий, среди которых встречаются фитопатогены (*Erwinia carotovora*), антагонисты патогенных микроорганизмов (*Bacillus subtilis*). Количественные показатели содержания отдельных видов бактерий варьируют от 10^6 до 10^8 КОЕ в пробе, индекс встречаемости находится в пределах 12,5 - 37,5%.

2. Видовой состав бактерий, присутствующих в кишечнике личинок почвенных насекомых, представлен 4 видами, среди них встречаются условно-патогенные микроорганизмы (*Kingella denitrificans*). Максимальные количественные показания изолированных бактерий достигают 10^8 КОЕ, индекс встречаемости находится в пределах 40 - 80%.

3. Показано, что все бактерии обладают каталазной и сахаролитической активностью, устойчивы к низким температурам, охватывают широкий диапазон pH.

Список использованных источников

1. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М.: Академия, 2003. 464 с.
2. Рабинович, М. Л. Успехи биологической химии / М. Л. Рабинович, М.С. Мельник. М.: Академия, 2000. 266 с.
3. Думова, В. А. Ассоциация бактерий, утилизирующих целлюлозы / В. А. Думова, М. В. Круглов // Микробиология. 2009. Т. 78, № 2. С. 268 - 274.
4. Плавильщиков, Н. Н. Определитель насекомых: Краткий определитель наиболее распространенных насекомых европейской части России / Н. Н. Плавильщиков, М.: Топикал, 1994. 544 с.
5. Егоров, Н. С. Практикум по микробиологии / Н. С. Егоров. М.: МГУ, 1976. 153 с.
6. Беклемишев, В. Н. Биоценологические основы сравнительной паразитологии. В. Н. Беклемишев. М.: Наука, 1970. 502 с.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New - York: Springer, 2001. Vol. 3. 1450 p.