

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.461.61:579.22:579.26

Оценка целлюлозоразрушающей активности актинобактерий, ассоциированных с муравьями

Ю.В. Закалюкина^{1,*} , А.Р. Зайцев¹ , М.В. Бирюков^{2,3} ¹Кафедра биологии почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Российская академия наук, Россия, 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Среди актинобактерий, выделенных из муравьев *Camponotus vagus*, *Formica cunicularia* и *Lasius niger*, а также материала их гнезд и интактных почв, был проведен отбор штаммов, обладающих высокой целлюлазной активностью на среде с карбоксиметилцеллюлозой, с применением красителя Конго красный. Тестирование культуральных жидкостей исследуемых штаммов на среде с карбоксиметилцеллюлозой в сравнении с растворами коммерческого препарата целлюлазы позволило произвести также количественную оценку активности отдельных штаммов, которая была подтверждена методом измерения эндо-1,4-глюконазной активности по методу с 3,5-динитросалициловой кислотой. Три наиболее активных штамма актинобактерий были выделены из муравьев *Camponotus vagus*, *Lasius niger* и *Formica cunicularia* и принадлежали к роду *Streptomyces*. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов *Streptomyces* sp. Fu₂, *Streptomyces* sp. Ln₉, *Streptomyces* sp. Pe₃ депонированы в GenBank под номерами MN227506, MN227508 и MG 705182 соответственно. Удельная эндоглюканазная и β-глюкозидазная активность данных штаммов соответствует таковой у целлюлозо- и лигнинразрушающих стрептомицетов, описанных в литературе.

Ключевые слова: актинобактерии, целлюлоза, целлюлазы, *Streptomyces*, муравьи, *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, *Formica cunicularia*

Целлюлоза — линейный полисахарид, состоящий из глюкозных субъединиц, соединенных β-1,4-гликозидными связями, самый распространенный биополимер на Земле. Обилие и доступность делают ее привлекательным сырьем для производства многих биотехнологически ценных продуктов, биоразлагаемых полимерных материалов, продуктов питания. Кроме того, учитывая современные тенденции на внедрение в производство «возобновляемых источников энергии», все более актуальным является использование целлюлозы для получения биотоплива [1]. К сожалению, в большинстве случаев основная часть целлюлозосодержащих отходов представляет собой сложную смесь целлюлозы с другими полимерами, балластными, а порой и токсичными примесями, что крайне затрудняет их переработку. Поэтому в большинстве случаев происходит утилизация таких отходов путем сжигания, что, помимо утраты перспективного сырья, приводит к увеличению концентрации парниковых газов и другим негативным последствиям для биосферы [2]. Решение данной задачи лежит в области биотехнологии, а первоочередной задачей является солюбилизация, расщепление целлюлозы до регулярных олигосахаридов, пригодных для дальнейшей переработки.

Биологическое разложение целлюлозы осуществляется комплексом целлюлаз, включающим, главным образом, эндоглюконазы (КФ 3.2.1.4) и экзоглюконазы (КФ 3.2.1.91), а также целлюбиазы (КФ 3.2.1.21). Для полного гидролиза природной целлюлозы до биодоступных мономеров необходим синергизм между всеми этими группами ферментов [1, 3]. Промышленно производятся и активно используются в различных отраслях целлюлазы, продуцируемые микроскопическими грибами, в основном представителями родов *Aspergillus* и *Trichoderma*. Однако целлюлазные системы ряда прокариот имеют свои уникальные особенности и могут обладать рядом преимуществ для биотехнологии: особыми оптимумами активности, субстратной специфичностью, термоустойчивостью [3]. Целлюлолитическую активность не раз отмечали у представителей порядка *Streptomycetales* [4, 5–9] — главным образом, среди представителей рода *Streptomyces*. Стрептомицеты — наиболее многочисленная группа мицелиальных прокариот в почвах, где они являются ведущими агентами в разложении целлюлозы и других природных полимеров [4, 7, 8, 10–12]. С недавнего времени внимание исследователей привлекают ассоциации микроорганизмов с бес-

позвоночными, питающимися древесиной или обитающими в ней, поскольку в таких сообществах могут обнаруживаться целлюлолитические микроорганизмы, развившие в результате коэволюции свойства, ценные для биотехнологии [2, 7–9, 13].

Несмотря на то, что многие исследователи обращались к теме поиска и выделения микроорганизмов-целлюлолитиков [2, 8–11, 13, 14], в этой области по-прежнему много методологических трудностей. Во-первых, природа целлюлозы сложна и гетерогенна, а во-вторых, работа с мицелиальными и медленно растущими формами прокариот делает выявление активных штаммов весьма трудоемким. Поэтому отработка методик поиска, выделения и эффективного анализа целлюлолитической активности актинобактерий по-прежнему очень актуальна.

Перспективными локусами для поиска микроорганизмов – активных продуцентов целлюлаз – могут являться гнезда черных муравьев-древоточцев *Camponotus vagus*, которые ранее не становились объектом подобного исследования. Этот западно-палеоарктический вид муравьев встречается по всей южной и средней Европе, на Украине, в южных областях России, на Кавказе и северо-западе Африки. Муравьи-дендробионты *C. vagus* предпочитают негустые лиственные и смешанные леса, сосновые боры, опушки, вырубки, где прогрызают ходы и камеры в сухой древесине [15]. В ходе жизнедеятельности эти муравьи постоянно контактируют как с отмершей древесиной, так и с почвой и, таким образом, могут создавать условия для отбора из окружающей среды штаммов микроорганизмов с заметной целлюлолитической активностью.

Целью настоящей работы является оценка перспективности природных локусов, связанных с муравьями *C. vagus*, с точки зрения выделения штаммов актинобактерий, обладающих целлюлозоразрушающей активностью. Кроме того, в задачи исследования входит оптимизация методик по выделению и отбору наиболее активных штаммов мицелиальных прокариот.

В конечном счете, расширение круга микробов-продуцентов целлюлаз, используемых в промышленности, может способствовать снижению стоимости ферментов для гидролиза растительной биомассы, что по-прежнему считается одной из основных задач достижения экономической целесообразности в конверсии лигноцеллюлозы [1].

В предыдущих работах мы сообщали о том, что из муравьев *Lasius niger* и *Formica cunicularia* были выделены мицелиальные прокариоты, в большинстве своем принадлежащие к роду *Streptomyces*, многие из которых проявляли целлюлолитическую активность [17]. В данной работе мы описываем выделение мицелиальных прокариот, связанных с муравьями-древоточцами,

а также представляем качественную и количественную оценку целлюлозоразрушающей способности у наиболее активных штаммов.

Материалы и методы исследования

Отбор образцов. Для исследования были выбраны два гнезда муравьев *C. vagus*: №1 – находящееся в Брянской области (Суземский район, дер. Березовка, 52.440009 N, 34.126288 E) и №2 – в Рязанской области (Касимовский район, пос. Елатьма, 55.004116 N 41.740807 E). Для поиска целлюлазноактивных актинобактерий были выбраны три типа субстратов: живые муравьи *C. vagus*, материал гнезда муравьев-древоточцев, представлявший собой древесину сосны разной степени разложенности с включениями мхов, копролитов личинок насекомых, перемешанных с почвой, а также фоновые почвы, находящиеся на расстоянии не менее чем в 10 м от гнезд. Отбор проб производился в летне-осенний период в 2014 и 2015 гг. Образцы в стерильных крафтовых пакетах и контейнерах в максимально короткие сроки доставлялись в лабораторию.

Выделение мицелиальных прокариот. Для исследования из каждого гнезда отбирали пять взрослых особей *C. vagus*, усыпляли эфиром и каждую отдельно асептически истирали в ступке с песком (стерилизованном в автоклаве при 121°C) и 20 мл стерильной воды в течение трех минут. Навески гнездового материала весом 0,2 г также помещали в 20 мл стерильной воды. Полученные суспензии взбалтывали на шейкере «Multi Reax» (Heidolph, ФРГ) 10 мин при 2000 об./мин, 10-кратно разводили стерильной водопроводной водой и проводили посев на питательную среду с крахмалом (г/л): крахмал растворимый – 20, K_2HPO_4 – 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5, KNO_3 – 1, $NaCl$ – 0,5, $FeSO_4$ – 0,01, агар – 20; а также на среду с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода (г/л): K_2HPO_4 – 1, $CaCl_2$ – 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3, $NaCl$ – 0,1, $FeCl_3$ – 0,01, $NaNO_3$ – 2,5, агар – 20. Для подавления роста микромицетов и граммотрицательных бактерий в среды перед разливом добавляли нистатин (250 мкг/мл) и налидиксовую кислоту (10 мкг/мл) соответственно. Посевы инкубировали при 28°C в течение 2–3 нед.

Выросшие колонии мицелиальных прокариот просматривали, подсчитывали, выделяли в отдельные морфотипы согласно общности фенотипических признаков [16]. Филогенетическое положение представителей отдельных морфотипов проводили по схеме, изложенной ранее [17]. Последовательности фрагмента гена 16S рРНК, полученные для представителей отдельных морфотипов, были депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); на их основе было построено филогенетическое дерево в программе MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>).

Качественная оценка общей целлюлазной активности. Исследование общей целлюлазной активности проводилось как у только что выделенных актинобактерий, так и у штаммов мицелиальных прокариот, изолированных ранее из муравьев *L. niger* и *F. cunicularia* [17] и хранящихся в 20%-ном глицерине при -70°C . Всего было исследовано 68 штаммов актинобактерий: 29 выделены из почв, 14 — из гнезд и 12 — из муравьев *C. vagus*; 8 культур относились к муравьям *L. niger* и 5 — к муравьям *F. cunicularia*.

Все культуры актинобактерий были подвергнуты исследованию на способность вырабатывать внеклеточные целлюлазы. Для этого культуры сеяли уколом на среду [13] следующего состава (на литр водопроводной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,5 г; KH_2PO_4 — 1 г; Na_2HPO_4 — 4 г; NaCl — 1,5 г; дрожжевой экстракт — 1 г; натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ; Akucell) — 10 г; Твин-80 — 1 мл; биотин — 1 мг; тиамин — 1 мг; агар — 20 г.

Спустя 14 сут культивирования при 28°C чашки с выросшими колониями окрашивали 0,1%-ным водным раствором красителя Конго красный (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин, затем дважды по 10 мин промывали 1М раствором NaCl [18]. По обесцвеченным зонам вокруг колоний судили о выделении внеклеточных целлюлаз. Сравнительную оценку целлюлазной активности изучаемых штаммов проводили на основе сопоставления индекса разложения КМЦ I_{CMC} (1):

$$I_{\text{CMC}} = \frac{S_{\text{zone}}}{S_{\text{colony}}}, \quad (1)$$

где S_{zone} — площадь осветленной зоны вокруг колонии штамма, мм^2 ,

S_{colony} — площадь колонии изучаемого штамма, мм^2 .

Для трех штаммов актинобактерий, характеризовавшихся максимальными значениями индекса I_{CMC} , была проведена полуколичественная оценка активности культуральной жидкости по гидролизу КМЦ на чашках Петри, а также исследованы эндо-1,4-глюканазная и β -глюкозидазная (целлюlobиазная) активность.

Исследование активности культуральных жидкостей штаммов актинобактерий. В ячейки 24-луночных планшетов (Corning, США) помещали по 2 мл жидкой среды, содержащей КМЦ [13], и затем инокулировали споровыми суспензиями исследуемых штаммов (250 мкл с концентрацией 10^6 кл/мл), приготовленными в стерильной воде с добавлением 0,06% Твин 80. Засеянные планшеты инкубировали на орбитальном шейкере Titramax 1000 (Heidolph, ФРГ) при 275 об./мин в течение 7 сут при 28°C . Затем из каждой лунки отбирали аликвоты 1 мл, помещали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали 5 мин при 13 тыс.об./мин в настольной миницентрифуге MiniSpin (Eppendorf, ФРГ). Супернатант отбирали

и использовали для количественного измерения активности внеклеточных целлюлаз.

В качестве положительного контроля целлюлазной активности использовали препарат целлюлазы (Sigma-Aldrich, C1184), полученный из *Aspergillus niger* (с активностью не менее 0,3 МЕ/мг, где за единицу (МЕ) принимают то количество фермента, которое освобождает один микромоль глюкозы при 37°C и pH 4,8 за 2 ч инкубации). Готовили серию последовательных разведений препарата с активностью: 1, 0,1, 0,01, 0,001 и т.д. МЕ/мл в 100 мМ ацетат-аммонийном буфере (pH 4,8). На среду с КМЦ с соблюдением стерильности устанавливали металлические полые цилиндрики («колодцы») диаметром 6 мм, в которые вносили по 100 мкл растворов препарата и культуральных жидкостей изучаемых штаммов. После суточной инкубации при 28°C проводили окрашивания чашек Конго красным и определяли индекс разложения КМЦ, как описано выше. Строили калибровочную зависимость I_{CMC} от активности коммерческого фермента и использовали ее для полуколичественной оценки целлюлазной активности изучаемых штаммов актинобактерий.

Для более точной количественной оценки эндо-1,4-глюканазной активности использовали метод измерения ферментативной активности целлюлаз по гидролизу КМЦ с определением высвободившихся в ходе ферментативного гидролиза восстанавливающих сахаров с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты [4, 19]. В пробирку, содержащую 300 мкл раствора КМЦ (20 мг/мл) в 100 мМ ацетат-аммонийном буфере (pH 4,8), вносили 100 мкл супернатанта исследуемой культуральной жидкости, интенсивно перемешивали и инкубировали в течение 60 мин при 40°C . Измерения оптической плотности при 540 нм проводили на микропланшетном сканере Infinite 200F (Tecan, Швейцария). По полученным результатам оценивали эндо-1,4-глюканазную активность (в МЕ), принимая за единицу то количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 микромоля глюкозы из КМЦ за минуту при 40°C и pH 4,8.

Для определения β -глюкозидазной активности выделенных штаммов актинобактерий использовали суррогатный субстрат с ковалентно пришитой флуоресцентной меткой — 4-метилумбеллиферил β -D-глюкопиранозид (Sigma Aldrich, США) [11]. Супернатанты культуральных жидкостей объемом 50 мкл помещали в ячейки 96-луночного планшета, в каждую лунку добавляли по 100 мкл рабочего раствора флуоресцентного субстрата в ацетат-амонийном буферном растворе (pH 4,8) и инкубировали 30 мин при 37°C . Флуоресценцию регистрировали в микропланшетном сканере Infinite 200F при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 465 нм.

За единицу β -глюкозидазной активности (МЕ) принимали то количество фермента, кото-

рое катализирует высвобождение 1 микромоля 4-метилумбеллиферила в минуту при 37°C и pH 4,8 [11]. Все данные по целлюлазной активности приводили в расчете на общее содержание белка, которое оценивали по методу Бредфорд [20], используя растворы бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) как стандарты.

Все анализы и измерения проводили в трехкратной повторности, результаты выражали в виде средних значений с указанием доверительных интервалов (определяемых через среднеквадратичное отклонение согласно распределению Стьюдента для малых выборок) при уровне значимости 0,05. Обработка результатов исследований и графическое представление материалов осуществлялись с использованием программы Excel 10 (Microsoft Office).

Результаты и обсуждение

Все исследуемые штаммы мицелиальных прокариот были разделены на группы в зависимости от источника выделения (рис. 1) и исследованы на предмет способности расти и утилизировать КМЦ в качестве целлюлозного субстрата. Об уровне общей целлюлазной активности судили по коэффициенту разложения КМЦ (I_{CMC}), причем при расчете использовали соотношения площадей (1), а не ширину образовавшегося гало. Такой подход представляется более корректным, поскольку при росте на агаре и точечная, и крупная колонии могут образовать зону гидролиза одинаковой ширины. Однако очевидно, что при прочих равных колония меньшей площади может обладать большей гидролитической активностью.

Исследование выделенных из разных источников штаммов актинобактерий на способность гидролизовать целлюлозный субстрат (КМЦ) показало, что среди актинобактерий, выделенных из гнезд муравьев-древоточцев *C. vagus*, доля активных штаммов ($I_{CMC} \geq 10$) составляет 100% (рис. 1). Подобную целлюлазную активность продемон-

стрировала только половина штаммов, выделенных непосредственно из муравьев-древоточцев (рис. 1). Примечательно, что штаммы актинобактерий, выделенных из интактных почв, представляли собой практически равномерные ряды от активных до неактивных форм, в их числе были 13 штаммов, которые не росли или не образовали зон гидролиза на среде с КМЦ, и соответственно не отражены на диаграмме. Среди актинобактерий, выделенных из муравьев *F. cunicularia* и *L. niger*, доля активных разрушителей КМЦ была меньше 50%, однако среди них обнаружили наиболее активные изоляты ($I_{CMC} > 25$) (рис. 1).

Основная часть актинобактерий, изученных в рамках данной работы, принадлежала к роду *Streptomyces* как к наиболее распространенному и многочисленному в большинстве природных локусов наземных экосистем. Тем не менее, даже без применения селективных приемов для выделения «редких таксонов», нами были изолированы представители родов: *Amycolatopsis*, *Kribella*, *Micromonospora* (рис. 2).

Для дальнейшего изучения целлюлазной активности были выбраны три штамма, проявившие самую значительную активность на среде с КМЦ — Fu₂, Ln₉ и Pe₃ (рис. 1). Все три изолята принадлежали к роду *Streptomyces* (табл. 1): штамм Pe₃ выделен из муравьев *C. vagus* (гнездо №1), штаммы Fu₂ и Ln₉ выделены из взрослых рабочих особей *F. cunicularia* и *L. niger* соответственно [17].

Окраска агаризованной среды с КМЦ красителем Конго красный позволяет визуально обнаружить штаммы, растущие на данной среде и способные расщеплять целлюлозу, за счет реакции образования комплекса между красителем и негидролизированным полимером [2, 18]. В этом случае метод является качественным и характеризуется высокой скоростью, производительностью и относительной дешевизной, позволяя одновременно оценивать широкий круг штаммов. Ради-

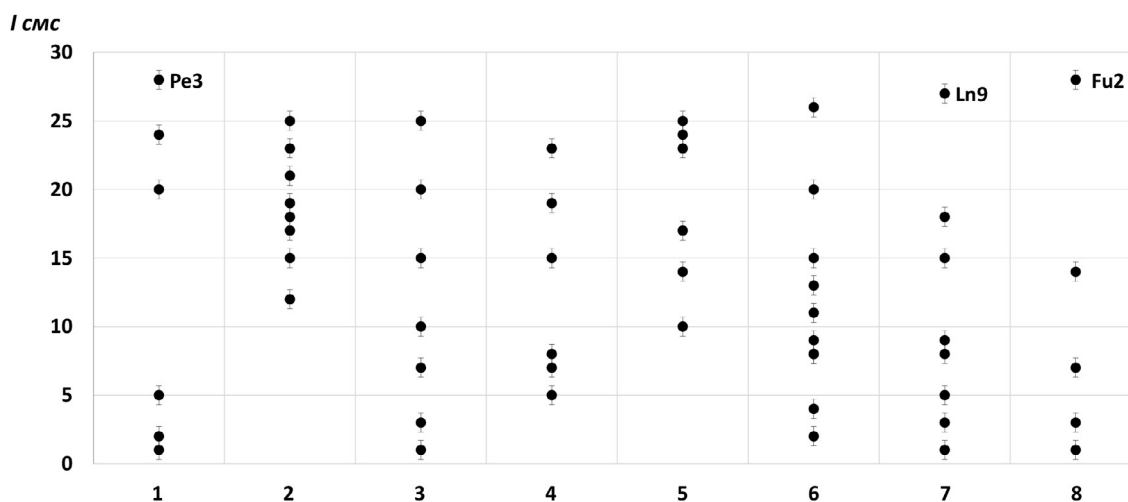


Рис. 1. Целлюлазная активность актинобактерий (оцениваемая по I_{CMC} — индексу разложения КМЦ), выделенных из различных местообитаний: из муравьев *C. vagus*, отобранных в Брянской (1) и Рязанской (4) области; материала их гнезд (2, 5); интактных почв (3, 6), а также штаммов, выделенных [17] из муравьев *L. niger* (7) и *F. cunicularia* (8).

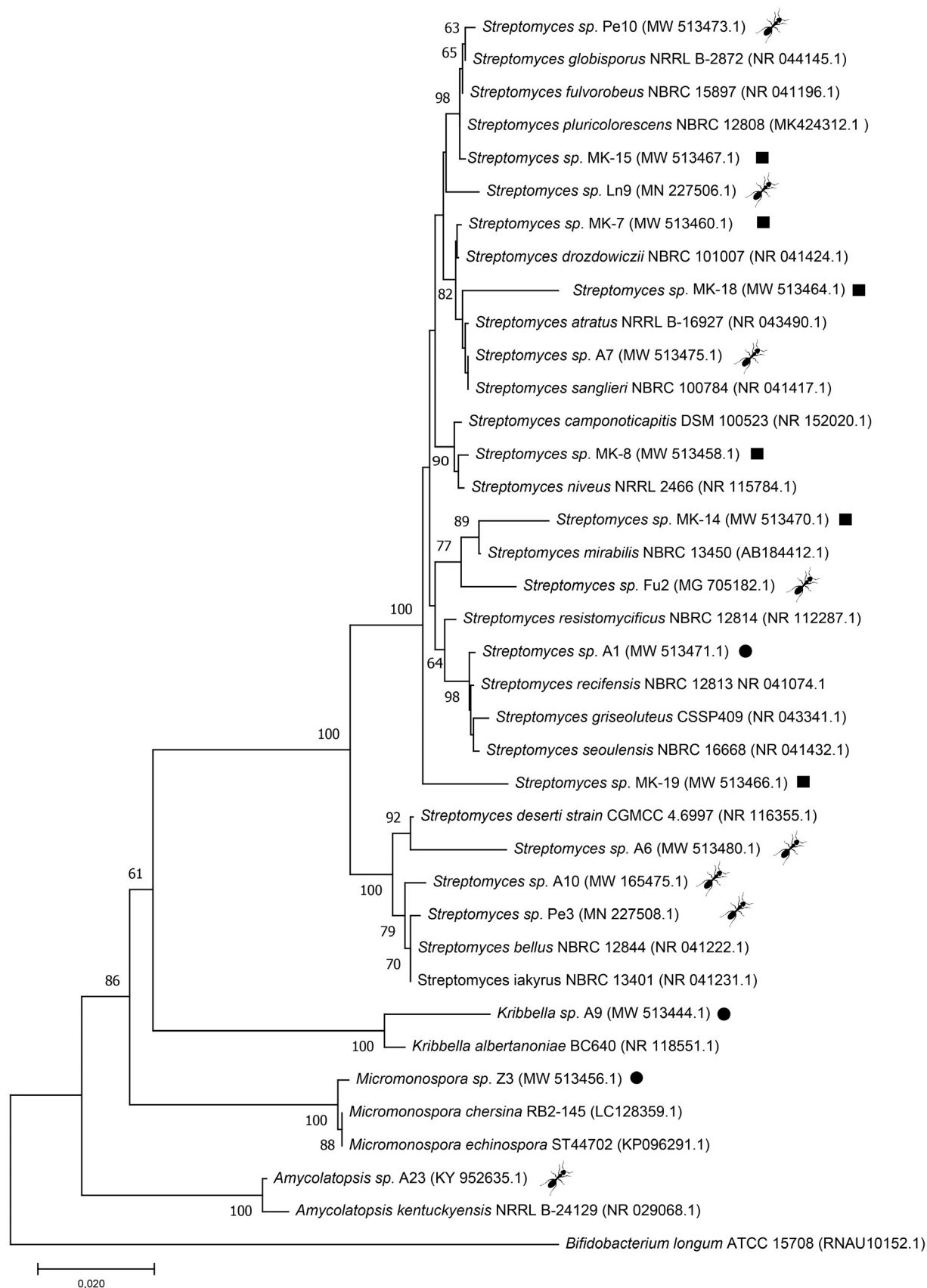


Рис. 2. Филогенетическое положение новых изолятов, выделенных из муравьев различных видов (ant), их гнезд (circle) и интактных почв (square), а также типовых штаммов известных видов, наиболее близких им генетически, на основании анализа последовательностей фрагмента гена 16S рРНК (в скобках указаны номера доступа последовательностей в GenBank). Дерево построено методом присоединения соседей (neighbour-joining method). Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитаны с использованием модели Тамуры-Ней (Tamura-Nei's model). Указаны значения (выше 60%) бутстрэп-анализа для 1000 альтернативных деревьев. Масштаб соответствует двум заменам на каждые 100 нуклеотидов. Штамм *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 выбран как референсный организм, не принадлежащий к филуму Actinobacteria.

альная диффузия фермента в агаровую пластину позволяет легко определить границу его активности — за счет четкого различия окрашенной и неокрашенных зон. Поскольку диаметр зоны диффузии фермента пропорционален логарифму его концентрации [18], данный метод также может быть использован для полуколичественной оценки целлюлолитической активности культуральных жидкостей изучаемых микроорганизмов. Необходимым условием для такого исследования является использование серии растворов коммерческого препарата целлюлазы для построения калибровочной зависимости (рис. 3). Графическая оценка КМЦ-активности супернатантов штаммов *Pe*₃, *Ln*₉ и *Fu*₂ по калибровочной прямой показала (рис. 3), что у изучаемых культуральных жидкостей значения активности предположительно лежат в пределах от 0,1 до 1 МЕ/мл соответствующей активности препарата целлюлазы *Aspergillus niger*.

Для более точной оценки целлюлолитической активности широко используется методика, со-

стоящая в измерении количества редуцирующих сахаров, образующихся после взаимодействия фермента с целлюлозным субстратом в присутствии 3,5-динитросалициловой кислоты [19]. При применении этой методики рекомендуется проводить измерения в пробирках объемом 25 мл, однако, на наш взгляд, исследование целлюлазной активности в формате микропланшета зарекомендовало себя как столь же точный, но гораздо более эффективный метод [22], позволяющий исследовать одновременно большое количество проб при очень малом объеме реакционной смеси.

Результаты оценки активности внеклеточных целлюлаз штаммов *Pe*₃, *Ln*₉ и *Fu*₂ более точным методом с динитросалициловой кислотой (табл. 2) показали значительное сходство с целлюлазной активностью, найденной графически (рис. 3), что позволяет рекомендовать последний как простой, не требующий больших материальных вложений и эффективный подход к поиску целлюлозоразрушающих штаммов.

Таблица 1

Характеристика штаммов актинобактерий, проявивших наибольшую целлюлазную активность

Признаки	Штаммы		
	<i>Fu</i> ₂	<i>Ln</i> ₉	<i>Pe</i> ₃
Источник выделения	Муравьи <i>F. cunicularia</i>	Муравьи <i>L. niger</i>	Муравьи <i>C. vagus</i>
Цвет воздушного мицелия*	Белый/ светло-серый/ серый	Светло-серый/серый/ серый	Отсутствовал/ светло-серый/ серый
Цвет субстратного мицелия*	Буро-черный/ темно-серый/ бесцветный	Бесцветный/желтоватый/ желтый	Бурый/ бесцветный/ буроватый
Наличие растворимого пигмента*	Буроватый/ отсутствовал/ отсутствовал	Буроватый/желтоватый/ желтый	Буроватый/отсутствовал/ отсутствовал
Образование меланоидного пигмента*	+	+	+
Форма цепочек спор**	RA (крючки, петли)	RF (прямые, короткие)	S (спиральные)
Ближайший типовой штамм	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NRRL B-3239	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> NBRC 13348	<i>Streptomyces iakurys</i> NBRC 13401
Номер доступа в GenBank	MG705182.1	MN227506.1	MN227508.1

* — описание фенотипических признаков проводилось на средах ISP2, ISP3, ISP4 [21],

** — на среде ISP3 на 10–14-е сут.

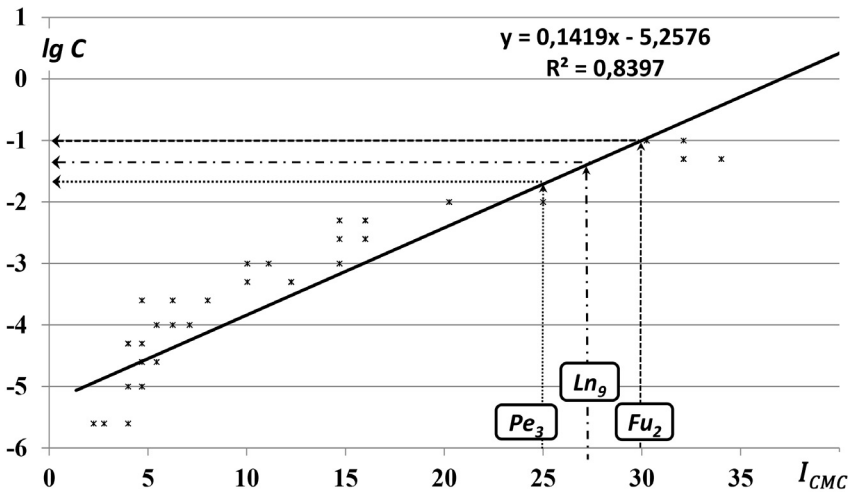


Рис. 3. Графическое определение активности гидролиза КМЦ (lgC) культуральными жидкостями штаммов *Streptomyces* sp. *Fu*₂ (1,0 МЕ/мл), *Streptomyces* sp. *Ln*₉ (0,5 МЕ/мл), *Streptomyces* sp. *Pe*₃ (0,3 МЕ/мл) по индексу разложения КМЦ (*I*_{CM}): калибровочная прямая построена по индексам разложения КМЦ для серии растворов коммерческой целлюлазы (Sigma-Aldrich, C1184) с известными значениями активности.

Таблица 2

Активность эндоцеллюлаз и целлюлаз отдельных штаммов актинобактерий, выделенных из муравьев

Штаммы	Содержание белка, мг/мл	Эндо-1,4-глюконазная активность, МЕ/мл	Удельная эндо-1,4-глюконазная активность, МЕ/мг белка	β -глюкозидазная активность, МЕ/мл	Удельная β -глюкозидазная активность, МЕ/мг белка
Fu ₂	0,06±0,001	0,12±0,009	18,61±1,12	0,11±0,006	1,86±0,09
Ln ₉	0,05±0,002	0,52±0,041	10,42±0,52	0,07±0,006	1,31±0,06
Pe ₃	0,03±0,002	1,11±0,076	4,0±1,96	0,001±0,0001	0,20±0,01

Культуры, показавшие способность к активно-му гидролизу растворимых соединений целлюлозы, могут отбираться для более подробных исследований, в частности, для оценки β -глюкозидазной активности. Целлюлазы (более точно — β -глюкозидазы) не только продуцируют глюкозу из целлюлозы, но и снижают опосредованную целлюлозой репрессию ферментов предыдущих этапов разложения целлюлозы — эндо- и экзоцеллюлаз, тем самым позволяя целлюлолитическим ферментам функционировать более эффективно [1].

У микроорганизмов внеклеточная β -глюкозидаза обычно продуцируется на гораздо более низком уровне, чем эндоглюконазы, поскольку дополняется также и деятельностью пула внутриклеточных целлюлаз, что согласуется с данными, полученными для штаммов актинобактерий Pe₃, Ln₉ и Fu₂ (табл. 2). В целом, целлюлолитическая активность актинобактерий, выделенных в рамках данного исследования, находится на сходном уровне с активностью целлюлозо- и лигнинразрушающих стрептомицетов, описанных в литературе [3–5].

Поиск целлюлозоразрушающих актинобактерий у различных видов насекомых, в особенности тех, чей жизненный цикл связан с древесной растительностью, является оправданным [7, 8, 13]. Исследователи полагают, что стрептомицеты, находящиеся в ассоциациях с подобными насекомыми, могут реализовывать «внутреннюю или внешнюю пищеварительную модель» [7]. «Внутренняя пищеварительная модель» подразумевает нахождение актинобактерий в желудочно-кишечном тракте хозяев, где они выделяют ферменты, способствующие перевариванию насекомыми сложных полимеров. Понятно, что такие взаимоотношения будут создаваться с теми насекомыми, которые питаются трудно разлагаемой растительной биомассой [9, 13]. «Внешняя пищеварительная модель» возникает, когда насекомые, прокладывая ходы в древесине, способствуют заселению ее сообществом дереворазрушающих микроорганизмов и затем используют в пищу продукты деградации растительной биомассы [7, 8, 23]. И хотя муравьи-древоточцы не питаются продуктами разложения древесины, в которой обитают, своей активной строительной деятельностью они могут способствовать заселению и формированию в гнездах сообществ микроорганизмов, способных к утилизации природных полимеров.

Действительно, в нашем исследовании все культуры, выделенные из гнезд муравьев-древоточцев,

проявляли заметную целлюлолитическую активность, в то время как доля активных штаммов, выделенных из муравьев *C. vagus*, не превышала 50%. Оказалось также, что и из муравьев других видов, таких как *F. cunicularia* и *L. niger*, могут быть выделены отдельные штаммы с высоким уровнем целлюлазной активности. Образцы почв, рассматриваемые в работе как интактные, закономерно послужили источником выделения наибольшего количества штаммов мицелиальных прокариот, однако среди них было обнаружено и наибольшее количество неактивных штаммов.

В наших предыдущих работах было показано, что актинобактерии, выделяемые из муравьев-древоточцев, обладают способностью к выделению метаболитов, обладающих антибактериальной [24, 25] и антигрибной активностью [26]. Микроскопические грибы являются ведущими агентами по разложению древесины в природе, но близкое соседство с ними в гнездах было бы для муравьев-древоточцев крайне неблагоприятно, поскольку многие микромицеты могут легко переходить от сапротрофного к паразитическому типу питания. Есть основания полагать, что между муравьями *C. vagus* и актинобактериями могут складываться так называемые «защитные симбиозы», описанные в литературе для других видов насекомых [27]. Заселение гнезд муравьев сообществами актинобактерий, способных использовать целлюлозу как источник питания, с одной стороны, и ограничивать рост грибов, с другой, могло бы служить защитой гнезд от заселения потенциально патогенными видами микроорганизмов.

Таким образом, гнезда муравьев-древоточцев *C. vagus* можно рассматривать как природный локус обитания мицелиальных прокариот, обладающих целлюлозоразрушающей активностью. Использование несложных, но эффективных методик по обнаружению и оценке целлюлазной активности у новых штаммов актинобактерий позволит шире использовать их для нужд биотехнологии.

От души благодарим анонимных рецензентов за ценные советы и помощь в подготовке материала. Работа выполнена без поддержки государственных или частных фондов. Исследования выполнены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lynd L.R. The grand challenge of cellulosic biofuels // Nat. Biotechnol. 2017. Vol. 35. N 10. P. 912–915.
2. Wilson D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis // Curr. Opin. Microbiol. 2011. Vol. 14. N 3. P. 259–263.
3. Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // Int. J. Microb. 2012. Vol. 2012: 578925.
4. Ventorino V., Ionata E., Birolo L., Montella S., Marcolongo L., de Chiaro A., Espresso F., Faraco V., Pepe O. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7: 2061.
5. Zhang Y.-H. P., Hong J., Ye X. Cellulase assays // Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 581 / Eds. J.R. Mielenz. Humana Press, 2009. P. 213–231.
6. McCarthy A.J., Williams S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review // Gene. 1992. Vol. 115. N. 1–2. P. 189–192.
7. Book A.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Takasuka T.E., Doering D.T., Adams A.S., Blodgett J.V.A., Clardy J., Raffa K.F., Fox B.G., Currie C.R. Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose // Appl. Environ. Microb. 2014. Vol. 80. N 15. P. 4692–4701.
8. 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* // Sci. Rep. 2013. Vol. 3: 1030.
9. Watanabe Y., Shinzato N., Fukatsu T. Isolation of actinomycetes from termites' guts // Biosci. Biotech. Bioch. 2003. Vol. 67. N 8. P. 1797–1801.
10. Wachinger G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W. L., Schrempf H. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli* // Appl. Environ. Microb. 1989. Vol. 55. N 10. P. 2653–2657.
11. Semêdo L.T.A.S., Gomes R.C., Bon E.P.S., Soares R.M.A., Linhares L.F., Coelho R.R.R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil // Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology / Eds. M. Finkelstein and B.H. Davison. Totowa, N.J.: Humana Press, 2000. P. 267–276.
12. Chater K.F., Biro S., Lee K.J., Palmer T., Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces* // FEMS Microbiol. Rev. 2010. Vol. 34. N 2. P. 171–198.
13. Pasti M.B., Belli M.L. Cellulolytic activity of Actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut // FEMS Microbiol. Lett. 1985. Vol. 26. N 1. P. 107–112.
14. Johnsen H.R., Krause K. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. N 1. P. 830–838.
15. Радченко А.Г. Обзор муравьев рода *Camponotus* (Hymenoptera, Formicidae) палеарктики. Введение. Подрод *Camponotus* s str // Зоол. журн. 1997. Т. 76. № 5. С. 554–564.
16. Zakalyukina Yu.V., Golichenkov M.V., Brovkina O.I., Putyatina T.S. Comparative study of actinomycete communities associated with *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants and their nests // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 3. P. 118–124.
17. Zakalyukina Yu.V., Biryukov M.V., Golichenkov M.V., Netrusov A.I. Phenotypic and phylogenetic characterization of actinomycetes isolated from *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 13–19.
18. 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 in enzymology, vol. 160 / Eds. J. Abelson and M. Simon. Academic Press, 1988. P. 59–74.
19. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // Pure Appl. Chem. 1987. Vol. 59. N 2. P. 257–268.
20. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation // The protein protocols handbook / Eds. J.M. Walker. Humana Press, 1994. P. 9–15.
21. Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. Vol. 16. N 3. P. 313–340.
22. Yu X., Liu Ya., Cui Yu., Cheng Q., Zhang Z., Lu J.H., Meng Q., Teng L., Ren X. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay // Saudi J. Biol. Sci. 2016. Vol. 23. N 1. Suppl. P. S93–S98.
23. Scott J.J., Oh D.C., Yuceer M.C., Klepzig K.D., Clardy J., Currie C.R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism // Science. 2008. Vol. 322. N 5898. P. 63.
24. Zakalyukina Y.V., Biryukov M.V., Shiriaev D.I., Komarova E.S., Skvortsov D.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Sergiev P.V., Osterman I.A. Nybomycin-producing streptomyces isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Biochimie. 2019. Vol. 160. P. 93–99.
25. Osterman I.A., Wieland M., Maviza T.P., et al. Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel // Nat. Chem. Biol. 2020. Vol. 16. N 10. P. 1071–1077.
26. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. Chemical ecology of *Streptomyces albidoflavus* strain A10 associated with carpenter ant *Camponotus vagus* // Microorganisms. 2020. Vol. 8. N 12: 1948.
27. Kaltenpoth M., Engl T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera // Funct. Ecol. 2014. Vol. 28. N 2. P. 315–327.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

После доработки 02.02.2021 г.

Принята в печать 08.02.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Study of cellulose-destroying activity of actinobacteria associated with ants

Yu.V. Zakalyukina^{1,*} , A.R. Zaytsev¹ , M.V. Biryukov^{2,3} 

¹Department of Soil Biology, School of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Sciences, Bol'shaya Pirogovskaya ul. 11, Moscow, 119021, Russia

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Among actinobacteria associated with various species of ants, their nests and intact soils, cellulolytic activity was screened on a medium with carboxymethyl cellulose using Congo red dye. Assessment of culture broses of tested strains on the CMC-plates and comparing them with titred solutions of the commercial cellulase preparation allowed to quantify their activity. This data were confirmed by the method of evaluating endo-1,4-gluconase activity according to the DNS method. The three most active strains of actinobacteria were isolated from the ants *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, and *Formica cunicularia* and belong to the genus *Streptomyces*. The 16S rDNA sequences of the *Streptomyces* sp. Fu₂, *Streptomyces* sp. Ln₉, and *Streptomyces* sp. Pe₃ strains were deposited in the GenBank under the numbers MN227506, MN227508, and MG 705182 respectively. Specific endoglucanase and β -glucosidase activity of this strains corresponds to that of cellulose- and lignin-destroying streptomycetes described in the literature.

Keywords: actinobacteria, cellulose, cellulase, *Streptomyces*, ants, *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, *Formica cunicularia*

Funding: The research was done without support of government or private funds.

Сведения об авторах

Закалюкина Юлия Владимировна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-44-46; e-mail: juline@soil.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8943-5761>

Зайцев Андрей Романович — магистр по направлению подготовки «Почвоведение» факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-44-46; e-mail: andrew050795@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0642-4069>

Бирюков Михаил Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-46; e-mail: biryukov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5765-1221>