

МРНТИ: 34.27.17

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

² Институт микробиологии НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

*iesmirnova@mail.ru

ПОДБОР ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.06

Аннотация

Основными кормо-бобовыми культурами в Казахстане являются люцерна и донник, но при их выращивании существуют проблема низкой всхожести семян. Для повышения всхожести и урожайности этих культур наиболее перспективным является применение биологического способа на основе использования целлюлолитических бактерий. Для разработки биоудобрения на основе этих бактерий необходима высокая рентабельность их производства. Одним из путей снижения затрат является подбор оптимальных источников питания для повышения выхода биомассы бактерий. Целью данного исследования являлся подбор оптимальных источников углерода для культивирования целлюлолитических бактерий с повышенным выходом биомассы и высокой активностью ферментов-целлюлаз. Проведен подбор источников углеродного питания для трех штаммов целлюлолитических бактерий. Установлено, что максимальное накопление биомассы бактерий происходит на питательной среде с пшеничной соломой. Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже и составляло 2,7–2,9 г/л, но активность целлюлаз при выращивании бактерий на этих источниках углерода была практически равной. Однако при наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа пшеничную солому невозможно использовать в качестве источника углерода. В связи с этим, для культивирования целлюлолитических бактерий в качестве источника углерода отобрана лактоза.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, культивирование, источники углерода, целлюлазная активность, лактоза

Основными кормо-бобовыми культурами в Казахстане являются люцерна и донник. Люцерна является ведущей кормовой культурой мирового масштаба, ее используют как для кормления свежескошенной зеленой массой, так и для заготовки силоса и сенажа [1]. Культура отличается долголетием, многоукосностью и дает высокий урожай зеленой массы. Корма из люцерны являются источником растительного белка и клетчатки, содержат кальций, калий, бета-каротин, витамин К, витамины группы В, а также микро- и макроэлементы, и другие полезные вещества для животных [2,3].

Не менее важной кормовой культурой является донник, который ещё недостаточно широко используется в кормопроизводстве Казахстана. Это высокоурожайная кормовая культура, не уступающая люцерне по питательной ценности. Преимуществом донника является его высокая экологическая пластичность, хороший рост на засоленных и малоплодородных почвах, наличие ценных агробиологических свойств, таких как, высокое содержание белка, способность к азотфиксации, засухоустойчивость, зимостойкость и скороспелость. Также при выращивании донника, за счет разложения корневой массы в

почве, повышается содержание гумуса. Установлено, что из растительной массы донника в почве образуется более 2 т/га активного гумуса [4]. Кроме того, донник является фитомелиорантом и способствует рассолению почв, что крайне важно для почв Казахстана [5,6].

При выращивании донника и люцерны существуют проблема низкой всхожести семян. Это связано с тем, что часть семян этих культур имеет плотную и твердую оболочку, препятствующую их всхожести, такие семена называют твердокаменными [7,8]. Поля, засеянные донником и люцерной, часто на 1/4 остаются пустыми, так как из посеянных семян всходит только 30–40%, а в некоторых регионах - менее 15-20% семян, что приводит к разреженности посевов и снижению урожайности культур [9,10].

Существуют различные способы повышения всхожести семян, наиболее часто используют механическую скарификацию, основанную на применении специальных машин-скарификаторов, разрушающих твердую оболочку семян. Однако при применении механической скарификации происходит повреждение не только оболочки, но и зародыша семян, что приводит к плесневению и загниванию семян и гибели проростков. Также скарификация требует значительных материальных и энергетических расходов.

В этой связи, разработка приемов повышения всхожести и урожайности кормовых культур на основе биологических способов имеет высокую актуальность. Наиболее эффективным биологическим методом является обработка семян целлюлолитическими бактериями. Целлюлолитические бактерии синтезируют особые ферменты - целлюлазы, которые частично разрушают твердую оболочку семян, делая ее менее плотной для прорастания. Этот процесс заменяет механическую скарификацию семян.

При создании биоудобрения важным фактором является рентабельность его производства. Одним из путей снижения затрат на его производство является подбор оптимальных источников питания для повышения выхода биомассы бактерий с единицы затрачиваемого углеродного субстрата.

Питательной средой для культивирования целлюлолитических бактерий является элективная среда Гетчинсона, в которой источником углерода является пшеничная солома. При наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа этот источник углерода использовать невозможно, поэтому был проведен альтернативный подбор источников углеродного питания. Целью данного исследования являлся подбор оптимального источника углерода для культивирования целлюлолитических бактерий с повышенным выходом биомассы этих бактерий с высокой активностью ферментов-целлюлаз.

Материалы и методы

Объектом исследований служили три отобранных штамма целлюлолитических бактерий (С-21(18)N, С-182К и С-21N2), показавших наиболее высокие результаты в лабораторных и полевых опытах.

Культивирование микроорганизмов проводили на элективной жидкой питательной среде Гетчинсона глубинным способом на качалке со скоростью вращения 180 об/мин в колбах Эрленмейера (750 мл) при объеме среды 250 мл. Оптимальные параметры культивирования бактерий определяли по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл культуральной жидкости (титр клеток).

Титр бактериальной суспензии определяли методом посева на питательные среды. Для этого на поверхность агаризованной питательной среды в чашки Петри стерильной

пипеткой наносили 0,1 мл соответствующего разведения микроорганизмов. После посева чашки Петри помещали в термостат крышками вниз. Подсчет выросших колоний осуществляли через 3-5 суток. Полученные данные подставляли в формулу:

$$M = A \times 10^n \div V,$$

где M - количество клеток в 1 мл; A - среднее количество колоний при высеивании из данного разведения; V - объем суспензии в мл, взятой для посева; 10 - коэффициент разведения; n - порядковый номер разведения [11].

Для определения оптимального источника углеродного питания культуры бактерий выращивали при температуре 30 °С и кислотности среды pH 6,7-7,0. Источниками углеродного питания служили глюкоза (1,0%), лактоза (1,0%), водорастворимая натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ 2,0%) и пшеничная солома (2,0%). Бактерии выращивали в термостатируемом шейкере при 180 об/мин и температуре 30°С, длительность культивирования составляла 96 часов.

Для определения целлюлазной активности бактерий использовали чашечный метод, основанный на способности красителя конго-рот образовывать нерастворимый комплекс с целлюлозой. В агаризованной среде пробивали лунки, в которые вносили 0,1 мл двухсуточной культуральной жидкости бактерий с титром 1×10^8 кл/мл. Чашки Петри инкубировали на протяжении 24 часов в термостате при 30°С. После чего среду окрашивали 1% раствором конго-рот, выдерживали 15 минут и смывали 1 М раствором NaCl. В качестве контроля в лунки вносили стерильную среду. Целлюлазную активность бактерий определяли по диаметру зон гидролиза (зона просветления) агаризованной среды с 0,1% Na-КМЦ и выражали ее в ед/мл. [12,13]. Общую целлюлазную активность определяли методом Мандельс-Вебера [14].

Биомассу микроорганизмов определяли нефелометрически на спектрофотометре PD-303 ("Arel", Japan), выражали в единицах оптической плотности (отн. ед. ОП) и пересчитывали по калибровочной кривой на вес абсолютно сухой биомассы (АСБ, г/л).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 10.0» [15].

Результаты и обсуждение

Для выращивания микроорганизмов в производственных условиях необходимо провести подбор питательных сред культивирования исходя из их потребностей в питательных веществах. Эти вещества должны обеспечивать активный рост микроорганизмов и высокое накопление биомассы. Кроме того, питательные среды для культивирования микроорганизмов должны способствовать синтезу биологически активных веществ, таких как ферменты, витамины и антибиотики.

Подбор источников питания проводился по следующим параметрам: накопление биомассы и активность ферментов целлюлаз. Целлюлазная активность бактерий является одним из основных индикаторов при разработке биоудобрения на основе целлюлолитических бактерий для повышения всхожести семян кормо-бобовых культур. Ферменты-целлюлазы частично разрушают твердую оболочку семян, облегчая их прорастание, и, тем самым, повышая всхожесть.

Для подбора источников углеродного питания для бактерий использовали питательную среду Гетчинсона с глюкозой, лактозой, Na-КМЦ и пшеничной соломой.

Бактерии выращивали в термостатируемом шейкере, после окончания культивирования определяли накопление биомассы и активность целлюлаз. Биомассу бактерий выражали в г/л абсолютно сухой биомассы (АСБ).

Результаты по накоплению биомассы бактериями при росте на разных источниках углерода представлены на рисунке.

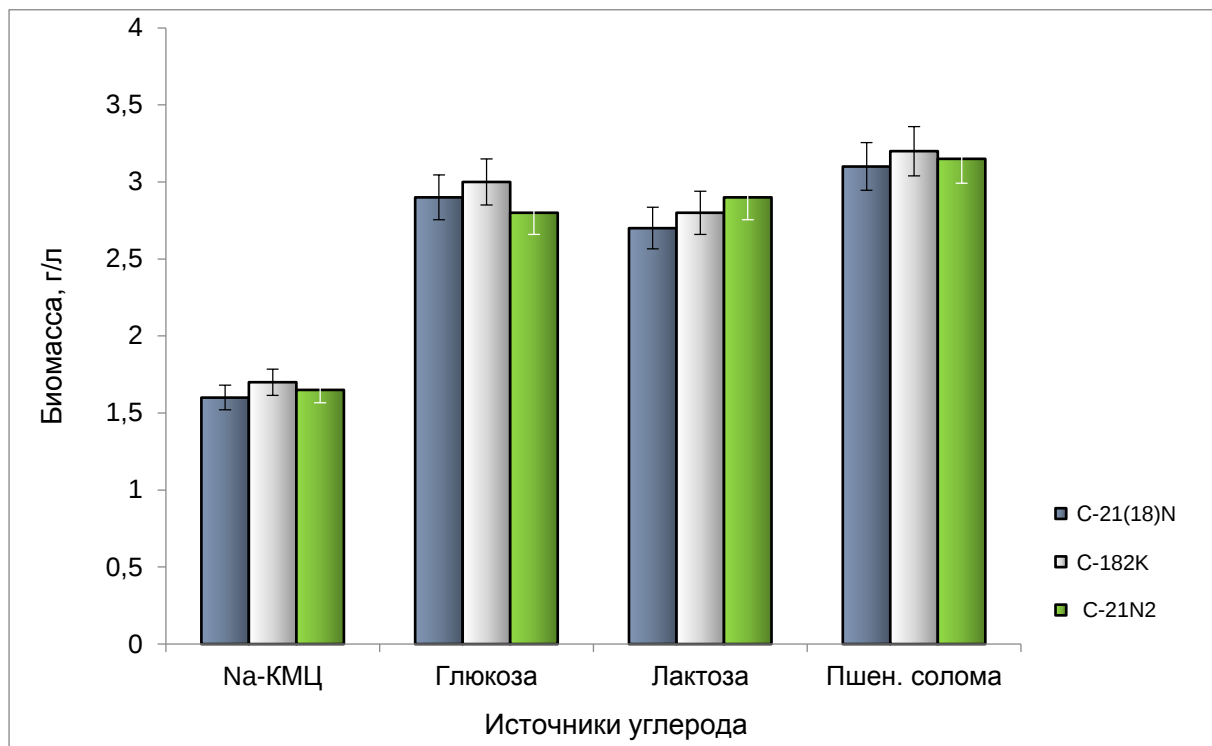


Рисунок - Накопление биомассы целлюлолитическими бактериями при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода

На рисунке видно, что максимальное накопление биомассы отмечено на питательной среде с пшеничной соломой, взятой в качестве источника углерода, и оно составляло 3,1–3,2 г/л, минимальное накопление биомассы было на питательной среде, где в качестве источника углерода использовали Na-KMЦ (1,6–1,7 г/л). Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже, чем на среде с пшеничной соломой, и составляло 2,7–2,9 г/л.

Изучение влияния источников углерода на целлюлазную активность бактерий приведено в таблице.

Таблица - Целлюлазная активность бактерий при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода

Источник углерода	Концентрация, %	Целлюлазная активность, ед/мл		
		C-21N2	C-182K	C-21(18)N
Пшеничная солома	2,0	5,4±0,01	5,4±0,03	5,5±0,01
Глюкоза	1,0	4,4±0,01	4,0±0,01	4,2±0,01
Лактоза	1,0	5,5±0,02	5,3±0,03	5,4±0,02
Na-КМЦ	2,0	4,8±0,01	4,6±0,01	4,7±0,01
Примечание - уровень доверительной вероятности $p < 0,01$				

Исследования показали (таблица), что максимальная целлюлазная активность штаммов выявлена на питательной среде с пшеничной соломой, что составило 5,4–5,5 ед/мл, минимальная - на среде с глюкозой - 4,0–4,4 ед/мл.

Установлено, что при росте бактерий на питательной среде с лактозой целлюлазная активность составляла 5,3–5,5 ед/мл и была практически равной аналогичному показателю при росте бактерий на питательной среде с пшеничной соломой (5,4–5,5 ед/мл).

Заключение

Таким образом, проведен подбор источников углеродного питания для трех наиболее перспективных штаммов целлюлолитических бактерий. Установлено, что максимальное накопление биомассы бактериями происходит на питательной среде с пшеничной соломой. Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже и составляло 2,7–2,9 г/л, но активность целлюлаз при выращивании бактерий на этих источниках углерода была практически равной. Однако при наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа пшеничную солому невозможно использовать в качестве источника углерода. В связи с этим, для культивирования целлюлолитических бактерий в качестве источника углерода отобрана лактоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP08855656.

Литература:

- 1 Марченко А.Ю., Забашта Н.Н., Головки Е.Н. Сенаж из люцерны и злаково-бобовых смесей с использованием биоконсерванта «Альбит-корм» // Сельскохозяйственный журнал. - 2016. - № 9. - С. 120–123.
- 2 Папета С.И., Молдабаевой Г.С., Саган В.В., Помогаева Д.В. Люцерна, эспарцет, пырей: местные - значит, приспособленные. - URL: <https://agbz.kz/ljucerna-esparcet-pyrej-mestnye-znachit-prisposoblennye/> (дата обращения 08.04.2022).
- 3 Соболева Н. В., Бабичева И.А., Карамаев С.В., Карамаева А.С. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2016. - № 5(61). - С. 103–105.
- 4 Демидас Г. И., Захлебав М.В. Формирование густоты донника белого в однолетних и совместимых посевах с однолетними зерновыми культурами // Вестник Уманского национального университета садоводства. - 2017. - № 1. - С. 53–56.

5 Жумадилова Ж. Ш., Идрисова Д. Т., Абдиева К.М., Тауенов И.А., Тодерич К.Н. Мелиоративная и кормовая ценность многолетних трав на засоленных почвах Казахстанского Приаралья // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2018. - № 12. - С. 287-292.

6 Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M.V. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils. Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). P. 410-422. [https://doi: 10.1080/15440478.2015.1029202ff](https://doi.org/10.1080/15440478.2015.1029202ff).

7 Шатский И.М., Иванов И.С., Переprawo Н.И., Золотарев В.Н и др. Селекция и семеноводство многолетних трав в Центральном Черноземном регионе России. - Воронеж: ОАО «Воронежская областная типография», 2016. - 236 с.

8 Wang X.X., Chen L.L., Zhang Y.W., Mao P.S. Determination of hard rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds with near infrared spectroscopy. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2016. Vol. 36(3). P. 702–705.

9 Царев А.П., Царева М.А. Агробиологические основы формирования высокопродуктивных агрофитоценозов люцерны на корм и семена в Поволжье. - Саратов, 2010. - 264 с.

10 Игнатьев С.А., Регидин А.А., Грязева Т.В., Горюнов К.Н. Динамика изменения твердосемянности сортов люцерны в зависимости от сроков хранения семян // Зерновое хозяйство России. - 2019. - № 6(66). - С.46-49. DOI: 10.31367/2079–8725-2019-66-6-46-49.

11 Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика. - М.: Юрайт, 2019. - 315 с.

12 Khoirunnisa N.S., Anwar S., Santosa D.A. Isolation and selection of cellulolytic bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell. Biodiversitas. 2020. Vol. 21. P.1686-1696. DOI: 10.13057/biodiv/d210450.

13 Толченев А. А., Зубов Д. В., Сергеева А. В. Программные системы: теория и приложения. - Переславль-Залесский: Наука, 2009. - 216 с.

14 Mandels M., Weber W. The production of cellulose. Advances in Chemistry Series. 1996. Vol. 112. P. 395-434.

15 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10. - М.: Stat Soft, 2013. - 268 с.

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ «Микробиология и вирусология ғылыми-зерттеу орталығы» ЖШС, Алматы, Қазақстан

² Әзербайжан Ұлттық ғылым академиясының Микробиология институты, Баку, Әзірбайжан

*iesmirnova@mail.ru

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫ ӨСІРУ ҮШІН КӨМІРТЕКТІ АЗЫҚ КӨЗІН ТАҢДАУ

Түйін

Қазақстандағы негізгі азықтық және бұршақ дақылдары жоңышқа мен тәтті беде, бірақ оларды өсіргенде тұқымның өнгіштігінің төмендігі мәселесі туындайды. Бұл дақылдардың өнгіштігі мен өнімділігін арттыру үшін целлюлолитикалық бактерияларды қолдануға негізделген биологиялық әдісті қолдану ең перспективалы болып табылады. Осы бактериялар негізінде биотыңайтқышты жасау үшін оларды өндірудің жоғары рентабельділігі қажет. Шығындарды азайту жолдарының бірі бактериялық биомассаның шығымдылығын арттыру үшін оңтайлы тамақ көздерін таңдау болып табылады. Бұл зерттеудің мақсаты целлюлолитикалық бактерияларды өсіру үшін оңтайлы көміртегі көзін таңдау және целлюлоза ферменттерінің жоғары белсенділігі бар биомассаның жоғары

шығымдылығын алу болды. Целлюлолитикалық бактериялардың үш штаммы үшін көміртегімен қоректену көздерін таңдау жүргізілді. Бактериялық биомассаның максималды жинақталуы бидай сабаны бар ортада байқалғаны анықталды. Лактозасы бар ортада биомассаның жинақталуы біршама төмен болды және 2,7-2,9 г/л құрады, бірақ осы көміртек көздерінде бактерияларды өсіру кезіндегі целлюлазалардың белсенділігі бірдей дерлік болды. Алайда өндірістік типтегі ферментаторларда бактериялардың биомассасын ұлғайту кезінде бидай сабанын көміртегі көзі ретінде пайдалануға болмайды. Сондықтан целлюлолитикалық бактерияларды өсіру үшін көміртегі көзі ретінде лактоза таңдалды.

Кілтті сөздер: целлюлолитикалық бактериялар, өсіру, көміртек көздері, целлюлаза белсенділігі, лактоза

IRSTI: 34.27.17

I.E. SMIRNOVA^{1*}, Sh.A. BABAEVA², E.R. FAYZULINA¹,
L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOV¹

¹ LLC “Research and Production Center for Microbiology and Virology”, Almaty, Kazakhstan

² Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

* iesmirnova@mail.ru

SELECTION OF CARBON FEED SOURCES FOR CULTIVATION OF CELLULOLITIC BACTERIA

Summary

The main fodder and legume crops in Kazakhstan are alfalfa and sweet clover, but when growing them, there is a problem of low seed germination. To increase the germination and productivity of these crops, the most promising is the use of a biological method based on the use of cellulolytic bacteria. To create a biofertilizer based on these bacteria, a high profitability of its production is required. One of the ways to reduce the cost of fertilizer production is the selection of optimal nutrition sources to increase the yield of bacterial biomass. The purpose of this study was to select the optimal carbon source for the cultivation of cellulolytic bacteria and to obtain an increased yield of biomass with a high activity of cellulase enzymes. The selection of sources of carbon nutrition for three strains of cellulolytic bacteria was carried out. It was established that the maximum accumulation of bacterial biomass was noted on the medium with wheat straw. The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower and amounted to 2.7-2.9 g/l, but the activity of cellulases when growing bacteria on these carbon sources was almost equal. However, when increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, wheat straw cannot be used as a carbon source. Therefore, for the cultivation of cellulolytic bacteria, lactose was selected as a carbon source.

Keywords: cellulolytic bacteria, cultivation, carbon sources, cellulase activity, lactose

The main forage and legume crops in Kazakhstan are alfalfa and sweet clover. Alfalfa is the world's leading fodder crop; it is used both for feeding freshly cut green mass and for harvesting silage and haylage [1]. The culture is distinguished by longevity, multi-cutting and gives a high yield of green mass. Alfalfa feed is a source of vegetable protein and fiber, contains calcium, potassium, beta-carotene, vitamin K, B vitamins, as well as micro and macro elements, and other useful substances for animals [2,3].

An equally important crop is the sweet clover, which is not widely used in the fodder production of Kazakhstan. This is a high-yielding fodder crop, which is not inferior to alfalfa in

terms of nutritional value. The advantage of sweet clover is its high ecological plasticity, it grows well on saline and infertile soils, has a number of valuable agrobiological properties, such as high protein content, ability to fix nitrogen, drought resistance, winter hardiness and early maturity. Also, when growing sweet clover, due to the decomposition of the root mass in the soil, the humus content increases. It has been established that more than 2 t/ha of active humus is formed from the plant mass of sweet clover in the soil [4]. Also, sweet clover is a phytomeliorant and promotes soil desalination, which is extremely important for the soils of Kazakhstan [5,6].

When growing sweet clover and alfalfa, there is a problem of low seed germination. This is due to the fact that some of the seeds of these crops have a dense and hard shell that prevents their germination; such seeds are called hard stone [7,8]. Fields sown with sweet clover and alfalfa often remain 1/4 empty, since only 30–40% of the sown seeds germinate, and in some regions less than 15–20% of the seeds, which leads to sparse sowing and a decrease in crop yields [9, ten].

There are various ways to increase the germination of seeds, the most commonly used is mechanical scarification, based on the use of special scarifying machines that destroy the hard shell of seeds. However, when using mechanical scarification, damage occurs not only to the shell, but also to the seed embryo, which leads to mold and decay of the seeds, and the death of seedlings. Also, scarification requires significant material and energy costs.

In this regard, the development of methods for increasing the germination and yield of fodder legumes based on the use of biological methods is of high relevance. Cellulolytic bacteria are most suitable for developing a biological method for increasing germination. These bacteria synthesize special enzymes - cellulases, which partially destroy the hard seed coat, make it less dense and the seed sprout germinates easily. This process replaces the process of mechanical seed scarification.

When creating a biofertilizer, an important factor is the profitability of its production. One of the ways to reduce the cost of biofertilizer production is the selection of optimal food sources to increase the yield of bacterial biomass per unit of spent carbon substrate.

The nutrient medium for the cultivation of cellulolytic bacteria is the Hutchinson elective medium, in which the source of carbon is wheat straw. When increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, this carbon source cannot be used; therefore, a selection of carbon nutrition sources was carried out. The purpose of this study was to select the optimal carbon source for the cultivation of cellulolytic bacteria and to obtain an increased biomass yield of these bacteria with a high activity of cellulase enzymes.

Materials and methods

Three selected strains of cellulolytic bacteria (C-21(18)N, C-182K and C-21N2) served as the object of research, which showed the highest results in laboratory and field experiments.

The cultivation of microorganisms was carried out on the elective liquid nutrient medium of Getchinson by the deep method on a shaker with a rotation speed of 180 rpm in Erlenmeyer flasks (750 ml) with a medium volume of 250 ml. The optimal parameters for cultivating bacteria were determined by the number of colony forming units (CFU) in 1.0 ml of culture fluid (cell titer).

The titer of the bacterial suspension was determined by seeding on nutrient media. To do this, 0.1 ml of the appropriate dilution of microorganisms was applied to the surface of the agar nutrient medium in Petri dishes with a sterile pipette. After inoculation, the dishes were placed in a thermostat with the lids down. The colony growth was counted after 3-5 days. The data obtained were substituted into the formula:

$$M = A \times 10n \div V,$$

where M is the number of cells in 1 ml; A - the average number of colonies when seeded from a given dilution; V is the volume of the suspension in ml, taken for inoculation; 10 - dilution factor; n is the serial number of dilution [11].

To determine the optimal source of carbon nutrition, bacterial cultures were grown at a temperature of 30°C and pH 6.7-7.0. Glucose (1.0%), lactose (1.0%), water-soluble sodium carboxymethylcellulose (Na-CMC 2.0%) and wheat straw (2.0%) served as sources of carbon nutrition. The bacteria were grown in a thermostatically controlled shaker at 180 rpm and a temperature of 30°C, the duration of cultivation was 96 hours.

To determine the cellulase activity of bacteria and identify effective strains, a plate method was used, based on the ability of the Congo-rot dye to form an insoluble complex with cellulose. Wells were punched in an agar medium, into which 0.1 ml of a two-day culture liquid of the studied bacterial strains with a titer of 1×10^8 cells/ml was added. Petri dishes were incubated for 24 hours in a thermostat at 30°C.

After that, the medium was stained with 1% Congo-rot solution, kept for 15 minutes, and washed off with 1 M NaCl solution. Cellulase activity was assessed by the diameter of the cellulose hydrolysis zone (clearance) around the wells. As a control, sterile medium was instilled into the wells. The cellulase activity of bacteria was determined by the diameter of the zones of hydrolysis of the agar medium with 0.1% Na-CMC and expressed in U/ml. [12,13].

The total cellulase activity was determined by the Mandels-Weber method [14].

The biomass of microorganisms was determined nephelometrically on a PD-303 spectrophotometer (Apel, Japan), expressed in units of optical density (rel. OD units), and recalculated according to the calibration curve to the weight of absolutely dry biomass (ASB, g/L).

Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 10.0 software package [15].

Results and discussion

For the cultivation of microorganisms in industrial conditions, it is necessary to select culture media based on their nutrient requirements. These substances must ensure the active growth of microorganisms and a high accumulation of biomass. In addition, nutrient media for cultivating microorganisms should promote the synthesis of biologically active substances, such as enzymes, vitamins, and antibiotics.

The selection of food sources was carried out according to the following parameters: accumulation of biomass and activity of cellulase enzymes. The cellulase activity of bacteria is one of the main indicators in the development of biofertilizer based on bacteria to increase the germination of seeds of fodder legumes. Since, it is these enzymes that partially destroy the hard shell of seeds, make it easier for germination, and, thereby, increase their germination.

To select sources of carbon nutrition for bacteria, Hutchinson's medium with glucose, lactose, Na-CMC, and wheat straw was used. Bacteria were grown in a thermostatically controlled shaker; after bacterial cultivation, biomass accumulation and cellulase activity were determined. Bacterial biomass was expressed in g/l absolutely dry biomass (ADB).

The results on the accumulation of biomass by bacteria on different carbon sources are shown in the figure.

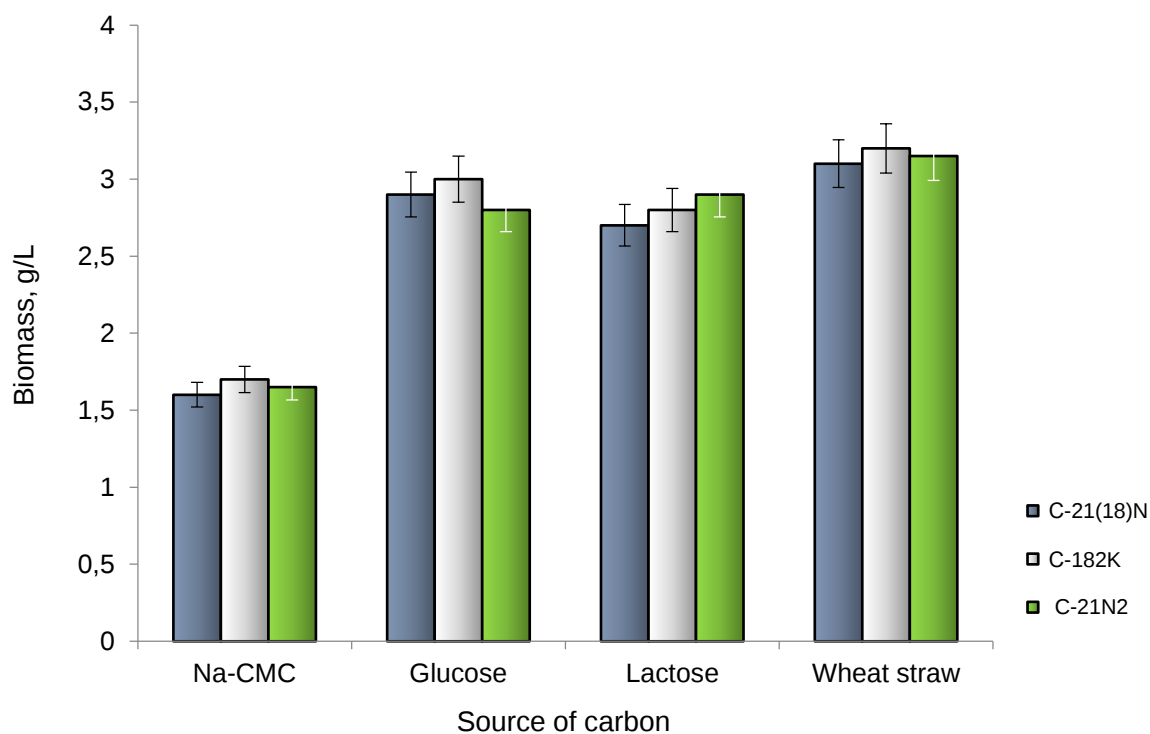


Figure - Accumulation of biomass by cellulolytic bacteria during cultivation on media with different carbon sources

The figure clearly shows that the maximum accumulation of biomass by bacteria was noted on the medium with wheat straw, taken as a carbon source, and it was 3.1-3.2 g/l, the minimum accumulation of biomass was on the medium with Na-CMC (1, 6-1.7 g/l). The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower than on the medium with wheat straw, and amounted to 2.7-2.9 g/L.

The study of the influence of carbon sources on the cellulase activity of bacteria is given in the table.

Table - Cellulase activity of bacteria during cultivation on media with different carbon sources

Source of carbon	Concentration, %	Cellulase activity, U/ml		
		C-21N2	C-182K	C-21(18)N
Wheat straw	2,0	5,4±0,01	5,4±0,03	5,5±0,01
Glucose	1,0	4,4±0,01	4,0±0,01	4,2±0,01
Lactose	1,0	5,5±0,02	5,3±0,03	5,4±0,02
Na-CMC	2,0	4,8±0,01	4,6±0,01	4,7±0,01
Note - confidence level $p < 0.01$				

Studies have shown (table) that the maximum total cellulase activity of the strains was noted on the medium with wheat straw and it was 5.4-5.5 U/ml, the minimum on the medium with glucose was 4.0-4.4 U/ml.

It was found that during the growth of bacteria on a medium with lactose, their cellulase activity was 5.3-5.5 U/ml and was almost equal to that of the growth of bacteria on a medium with wheat straw (5.4-5.5 U/ml).

Conclusion

Thus, the selection of sources of carbon nutrition for three strains of cellulolytic bacteria was carried out. It was established that the maximum accumulation of biomass by bacteria was noted on a medium with wheat straw. The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower and amounted to 2.7-2.9 g/l, but the activity of cellulases when growing bacteria on these carbon sources was almost equal. However, when increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, wheat straw cannot be used as a carbon source. Therefore, for the cultivation of cellulolytic bacteria, lactose was selected as a carbon source.

The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the grant project AP08855656.

References:

- 1 Marchenko A.YU., Zabashta N.N., Golovko E.N. Senazh iz lyucerny i zlakovo-bobovyh smesey s ispol'zovaniem biokonservanta «Al'bit-korm». Sel'skohozyajstvennyj zhurnal. 2016. № 9. S. 120–123.
- 2 Papeta S.I., Moldabaevoj G.S., Sagan V.V., Pomogaeva D.V. Lyucerna, esparcet, pyrej: mestnye - znachit, prisposoblennye. URL: <https://agbz.kz/ljucerna-esparcet-pyrej-mestnye-znachit-prisposoblennye/> (data obrashcheniya 08.04.2022).
- 3 Soboleva N.V., Babicheva I.A., Karamaev S.V., Karamaeva A.S. Kachestvo kormov iz lyucerny posevnoj i kozlyatnika vostochnogo. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2016. № 5(61). S. 103-105.
- 4 Demidas G.I., Zahlebaev M.V. Formirovanie gustoty donnika belogo v odnoletnih i sovместimyh posevah s odnoletnimi zernovymi kul'turami. Vestnik Umanskogo nacional'nogo universiteta sadovodstva. 2017. № 1. S. 53-56.
- 5 ZHumadilova ZH.SH., Idrisova D.T., Abdieva K.M., Tautenov I.A., Toderich K.N. Meliorativnaya i kormovaya cennost' mnogoletnih trav na zasolennyh pochvah Kazahstanskogo Priaral'ya // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy. 2018. № 12. S. 287-292.
- 6 Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M.V. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils. Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). R. 410-422. [https://doi: 10.1080/15440478.2015.1029202ff](https://doi.org/10.1080/15440478.2015.1029202ff).
- 7 SHatskij I.M., Ivanov I.S., Perepravo N.I., Zolotarev V.N i dr. Selekcija i semenovodstvo mnogoletnih trav v Central'no CHernozemnom regione Rossii. Voronezh: OAO «Voronezhskaya oblastnaya tipografiya», 2016. 236 s.
- 8 Wang X.X., Chen L.L., Zhang Y.W., Mao P.S. Determination of hard rate of alfalfa (Medicago sativa L.) seeds with near infrared spectroscopy. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2016. Vol. 36(3). R. 702-705.
- 9 Carev A.P., Careva M.A. Agrobiologicheskie osnovy formirovaniya vysokoproduktivnyh agrofитocenozov lyucerny na korm i semena v Povolzh'e. Saratov, 2010. 264 c.
- 10 Ignat'ev S.A., Regidin A.A., Gryazeva T.V., Goryunov K.N. Dinamika izmeneniya tverdosemyannosti sortov lyucerny v zavisimosti ot srokov hraneniya semyan. Zernovoe hozyajstvo Rossii. 2019. № 6(66). S.46-49. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-66-6-46-49.

- 11 Netrusov A.I., Kotova I.B. Mikrobiologiya: teoriya i praktika. M.: YUrajt, 2019. 315 s.
- 12 Khoirunnisa N.S., Anwar S., Santosa D.A. Isolation and selection of cellulolytic bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell. Biodiversitas. 2020. Vol. 21. P.1686-1696. DOI: 10.13057/biodiv/d210450.
- 13 Tolchenov A. A., Zubov D. V., Sergeeva A. V. Programmnye sistemy: teoriya i prilozheniya. - Pereslavl'-Zalesskij: Nauka, 2009. 216 s.
- 14 Mandels M., Weber W. The production of cellulose. Advances in Chemistry Series. 1996. Vol. 112. P. 395-434.
- 15 Borovikov V.P. Populyarnoe vvedenie v sovremennyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA 10. M.: Stat Soft, 2013. 268 s.