

УДК 579.64

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-2-73-79

**НОВЫЕ АССОЦИАЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ
ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ ПОЖНИВНЫХ ОСТАТКОВ**

© Д.В. Четверикова, М.Д. Бакаева, О.Н. Логинов

Разложение оставляемых на полях пожнивных остатков служит потенциальным источником биогенных элементов и способствует образованию гумуса. Для ускорения гумификации стерни, соломы и ботвы растений можно использовать активные, разрушающие целлюлозу микроорганизмы. Поскольку пожнив-ные остатки бедны азотом, способность некоторых видов бактерий к фиксации молекулярного азота может быть полезна при их микробиологической обработке.

С целью получения новых активных в отношении разрушения пожнивных остатков консорциумов микроорганизмов были изучены штаммы бактерий, способные к использованию целлюлозы в качестве единственного источника углерода и к активному росту на питательных средах для азотфиксирующих микроорганизмов. В лабораторных опытах измерены их нитрогеназная, целлюлозолитическая активность и скорость разложения соломы пшеницы и сорных злаков. Целлюлозолитическую активность отдельных штаммов и ассоциаций микроорганизмов оценивали по способности разрушать карбоксиметилцеллюлозу, количественным показателем разложения карбоксиметилцеллюлозы служило уменьшение кинематической вязкости ее геля.

Активнее разлагали карбоксиметилцеллюлозу ассоциации микроорганизмов. Входящие в них штаммы бактерий на основе культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и определения нуклеотидной последовательности, кодирующей 16S субъединицу рРНК, были идентифицированы как *Paenibacillus mucilaginosus*, *Cellulosomonas* sp., *Pseudomonas* sp. Входящий в ассоциацию бактериальный штамм *Pseudomonas* sp. ИБ G4 фиксировал атмосферный азот, его нитрогеназная активность составила 0.12 мкг N₂/(мл·час).

Численность микроорганизмов в среде с пшеничной соломой и надземной массой сорных злаков достигала величины порядка 10⁸ КОЕ/мл. Наблюдалось разрушение отрезков стеблей, их изучение под микроскопом показало мацерацию тканей. В случае с активными ассоциациями бактерий остаточная масса соломы пшеницы убывала на 27–31%, сорных трав на 38–44% за 60 суток эксперимента.

Таким образом, в результате скрининга были получены две бактериальные ассоциации, способные к активному разрушению пожнивных остатков. Ассоциация штаммов *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *Pseudomonas* sp. ИБ G4 более эффективно разрушала пшеничную солому и сухую надземную массу злаковых трав.

Ключевые слова: целлюлозолитические микроорганизмы, пожнивные остатки, солома.

Современные агроценозы представляют собой несбалансированные экосистемы и для поддержания своей продуктивности требуют ежегодного использования минеральных и органических удобрений. Особенно больших материальных затрат требует внесение в почву органических удобрений, которые важны для формирования гумуса, поддержания структуры почвы. Другим потенциальным источником биогенных элементов и гумусообразования

является разложение оставляемых на полях растительных остатков [1]. Но медленное разрушение пожнивных остатков не позволяет использовать их в достаточно больших объемах для существенного пополнения запаса питательных веществ почвы и может способствовать поддержанию в почве пула фитопатогенов и образующих токсинов микромицетов [2, 3]. Обработка стерни, соломы, ботвы активными целлюлозоразрушающими микроорганизмами

ЧЕТВЕРИКОВА Дарья Владимировна – к.т.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: biolab316@yandex.ru

БАКАЕВА Маргарита Дмитриевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: margo22@yandex.ru

ЛОГИНОВ Олег Николаевич – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: biolab316@yandex.ru

с целью ускорения их гумификации могла бы способствовать решению обозначенных выше проблем.

Как правило, пожнивные остатки бедны азотом и для активизации разлагающих их целлюлозолитических бактерий требуется использование азотных удобрений [4, 5]. Поэтому способность некоторых видов бактерий к фиксации молекулярного азота может быть полезна при микробиологической обработке содержащих целлюлозу остатков [6, 7]. Объединение способности к разложению целлюлозы и фиксации атмосферного азота в одном консорциуме микроорганизмов, способных к стабильному совместному росту, позволит создать биопрепарат для обработки пожнивных остатков с улучшенными свойствами без увеличения затрат на его производство.

Целью работы было получение новых консорциумов микроорганизмов, способных к активному разрушению содержащих целлюлозу субстратов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили поддерживаемые в Коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН штаммы бактерий, способные к использованию целлюлозы в качестве единственного источника углерода, и штаммы, способные к активному росту на питательных средах, предназначенных для аэробных азотфиксирующих микроорганизмов. Для поддержания культур микроорганизмов и в процессе изучения их целлюлозолитической активности была использована питательная среда Гетчинсона [8]. Нитрогеназную активность жидкой культуры бактерий определяли по методике, описанной в публикации [9]. Способность двух штаммов микроорганизмов стабильно расти в совместной культуре в жидкой питательной среде оценивали по результатам пяти пассажей.

Выделение тотальной ДНК из колоний бактерий выполняли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (АмплиСенс, Россия) согласно рекомендациям производителя. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК производили с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGTACCTTGTTACGACTT-3') [10]. Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 xL (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирования очищали с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Поиск последовательностей нуклеотидов генов рРНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемого штамма в базе данных GenBank осуществляли с помощью пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [11].

Целлюлозолитическую активность отдельных штаммов и составленных из них пар оценивали по способности разрушать карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) в процессе культивирования в течение 19 суток в питательной среде Гетчинсона, где КМЦ служила единственным источником углерода (в исходной концентрации 5 г/л и 30 г/л). Культуры микроорганизмов с титром 10^6 КОЕ/мл в количестве 1 мл вносили в колбы со 100 мл стерильной питательной средой в четырехкратной повторности и культивировали в термостате при температуре 28°C. Контролем служили варианты опыта без добавления целлюлозолитических микроорганизмов. Количественным показателем разложения КМЦ служило уменьшение кинематической вязкости культуральной жидкости, которое определяли с помощью вискозиметра Освальда при температуре 20°C.

С целью изучения способности целлюлозолитических бактерий к разрушению пожнивных остатков был поставлен лабораторный эксперимент. В 150 мл питательной среды помещали 1 г сухой пшеничной соломы или сухого сена из мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) и ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), высеянных летом 2018 г. на делянке в соотношении 1:1, стерилизовали автоклавированием, инокулировали 1 мл суспензии целлюлозолитических бактерий с титром 10^6 КОЕ/мл и выдерживали в термостате при 28°C. Для эксперимента отбирали сухие участки стеблей яровой пшеницы, а также стеблей и листьев мятлика лугового и ежи сборной, не поврежденные микроорганизмами, и делили на отрезки длиной 2.5–3.5 см. На 21 и 60 сутки растительные остатки извлекали, промывали от микроорганизмов, высушивали до постоянного веса и взвешивали. Численность целлюлозолитических бактерий в культуральной жидкости определяли путем микробиологического посева на агаризованную среду Гетчинсона с КМЦ в качестве источника углерода.

Результаты и их обсуждение. Семь штаммов целлюлозоразрушающих микроорганизмов из Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН были проверены на способность к совместному росту на селективной среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой в качестве источника углерода. Стабильный совместный рост в течение нескольких пассажей с активным разрушением полосок фильтровальной бумаги был установлен для двух ассоциаций, состоящих из штаммов ИБ Кар, ИБ G4 и ИБ E35. Входящий в ассоциацию бактериальный штамм ИБ G4 фиксировал атмосферный азот. Нитрогеназная активность данного штамма была измерена и составила 0.12 мкг N₂/(мл·час).

Штаммы бактерий, входящие в состав ассоциаций были идентифицированы путем определения нуклеотидной последовательности, кодирующей 16S субъединицу рРНК. Поиск гомологичных им последовательностей нуклеотидов в базе данных GenBank указал на принадлежность штамма ИБ Кар к виду *Paenibacillus*

mucilaginosus (99.57% сходства со штаммом *P. mucilaginosus* VKPM В-7519^T). Не удалось достоверно определить видовую принадлежность штамма ИБ G4. Нуклеотидная последовательность его рДНК имеет одинаковое 99.8% сходство с нуклеотидными последовательностями штаммов *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14^T и *Pseudomonas boetica* а390^T. Также неоднозначна видовая принадлежность штамма ИБ E35: 98.93% сходства с типовым штаммом *Cellulosomonas persica* Г^T и 98.83% сходства со штаммом *Cellulosomonas flavigena* DSM 20109^T.

Для сравнения целлюлозолитической активности ассоциаций микроорганизмов и чистых культур входящих в них бактериальных штаммов, их выращивали на жидкой питательной среде Гетчинсона с добавлением КМЦ. О разложении КМЦ судили по уменьшению вязкости питательной среды в процессе роста бактерий. Полученные значения кинематической вязкости культуральной жидкости представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Кинематическая вязкость культуральной жидкости целлюлозолитических микроорганизмов, сСт

Микроорганизмы	Исходное количество КМЦ в питательной среде, г/л	
	5	30
Контроль (без микроорганизмов)	5.40	3855.60
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35	1.33	6.18
<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ G4	3.46	1328.07
<i>P. mucilaginosus</i> ИБ Кар	3.70	2698.92
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35 + <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ G4	1.17	2.79
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35 + <i>P. mucilaginosus</i> ИБ Кар	1.16	3.99

Т а б л и ц а 2

Численность целлюлозолитических микроорганизмов в культуральной жидкости, КОЕ/мл

Микроорганизмы	Исходное количество КМЦ в питательной среде, г/л	
	5	30
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35	$(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(2.7 \pm 0.5) \cdot 10^8$
<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ G4	$(3.3 \pm 0.6) \cdot 10^6$	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^6$
<i>P. mucilaginosus</i> ИБ Кар	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(6.1 \pm 0.8) \cdot 10^6$
Ассоциация		
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35	$(4.4 \pm 0.5) \cdot 10^8$	$(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^8$
<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ G4	$(6.9 \pm 0.7) \cdot 10^7$	$(1.7 \pm 0.3) \cdot 10^8$
Ассоциация		
<i>Cellulosomonas</i> sp. ИБ E35	$(9.0 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(3.3 \pm 0.4) \cdot 10^8$
<i>P. mucilaginosus</i> ИБ Кар	$(7.0 \pm 0.5) \cdot 10^6$	$(8.2 \pm 0.7) \cdot 10^6$

Численность разрушающих целлюлозу микроорганизмов, КОЕ/мл

Субстрат	Штаммы бактерий	Отбор проб, сутки		
		3	21	60
Сухая масса злаковых трав	ИБ E35	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(7.9 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(6.7 \pm 0.3) \cdot 10^7$
	ИБ G4	$(2.1 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^7$
	ИБ Kar	$(5.9 \pm 0.5) \cdot 10^6$	$(5.0 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(2.2 \pm 0.4) \cdot 10^7$
	Ассоциация ИБ E35	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(8.1 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(8.0 \pm 0.3) \cdot 10^7$
	ИБ G4	$(4.0 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(3.0 \pm 0.5) \cdot 10^8$	$(3.4 \pm 0.6) \cdot 10^7$
	Ассоциация ИБ E35	$(9.3 \pm 0.5) \cdot 10^5$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(9.0 \pm 0.1) \cdot 10^7$
	ИБ Kar	$(7.2 \pm 0.6) \cdot 10^5$	$(1.9 \pm 0.3) \cdot 10^9$	$(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^7$
Солома пшеничная	ИБ E35	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^8$
	ИБ G4	$(2.1 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(8.0 \pm 0.3) \cdot 10^6$
	ИБ Kar	$(5.9 \pm 0.4) \cdot 10^6$	$(7.8 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(7.9 \pm 0.4) \cdot 10^7$
	Ассоциация ИБ E35	$(2.0 \pm 0.4) \cdot 10^6$	$(8.7 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^7$
	ИБ G4	$(3.0 \pm 0.5) \cdot 10^5$	$(3.2 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(3.0 \pm 0.3) \cdot 10^7$
	Ассоциация ИБ E35	$(3.5 \pm 0.3) \cdot 10^6$	$(7.3 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$(7.0 \pm 0.2) \cdot 10^7$
	ИБ Kar	$(5.0 \pm 0.7) \cdot 10^5$	$(1.3 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^7$

После культивирования штамма *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 вязкость среды уменьшилась в среднем в 4.3 раза при исходной концентрации КМЦ 5 г/л и в 624 раза при исходной концентрации КМЦ 30 г/л. Разрушение КМЦ в других вариантах опыта с чистыми культурами было не столь значительным. Наибольшей целлюлозолитической активностью в данном опыте обладали микробные ассоциации. Сравнение их между собой показало, что при содержании КМЦ 30 г/л ассоциация *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 + *Pseudomonas* sp. ИБ G4 более эффективно разрушает целлюлозный субстрат, в то время как при содержании КМЦ 5 г/л достоверной разницы установить не удалось.

Результаты определения титра целлюлозолитических микроорганизмов в культуральной жидкости представлены в табл. 2. В совокупности с данными о целлюлозолитической активности они позволяют предположить, что основным продуцентом целлюлаз выступает штамм *Cellulosomonas* sp. ИБ E35. Титр штамма *P. mucilaginosus* ИБ Kar сопоставим для чистой культуры и ассоциации с его участием. Данные о численности штамма *Pseudomonas* sp. ИБ G4 указывают на существенные преимущества, получаемые им при совместном культивировании со штаммом *Cellulosomonas* sp. ИБ E35. Фило-

новым с соавт. [12] показано, что представители рода *Pseudomonas* при совместном культивировании с бактериями другого вида на легкодоступном субстрате способны опережать их по скорости роста. Можно предположить, что штамм ИБ G4 при этом активно потребляет из среды промежуточные продукты расщепления целлюлозы, влияя тем самым на скорость разложения КМЦ. Высокий титр штамма *Pseudomonas* sp. ИБ G4 в совместной культуре можно объяснить также его способностью к фиксации атмосферного азота, за счет чего он не вступает в конкурентные отношения за соединения азота со штаммом *Cellulosomonas* sp. ИБ E35.

Исследуемые микроорганизмы были протестированы на потенциальную способность к разрушению пожнивных остатков. Опыт проводили в лабораторных условиях в жидкой питательной среде, в которую добавляли пшеничную солому или высушенную надземную массу злаковых трав в качестве единственного источника углерода.

После инокуляции среды изучаемыми штаммами микроорганизмов их численность возрастала до величины порядка 10^8 КОЕ/мл. К 60 суткам титр микроорганизмов сохранялся на достигнутом уровне или уменьшался для отдельных вариантов опыта в связи с лимитом питательных элементов в среде (табл. 3).

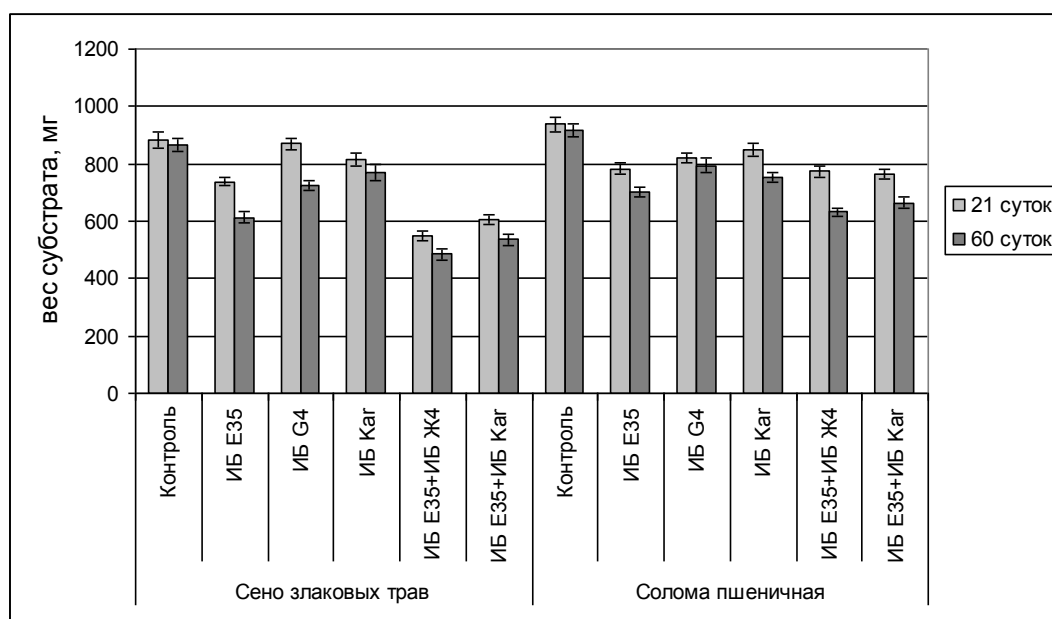


Рис. Остаточный вес пшеничной соломы и сена злаковых трав после культивирования разлагающих целлюлозу бактерий

В процессе культивирования наблюдалось разрушение отрезков соломы, а микроскопирование извлеченных из среды кусочков показало мацерацию тканей, более выраженную в вариантах опыта со штаммами *Cellulosomonas* sp. ИБ E35, *P. mucilaginosus* ИБ Kar и ассоциациями.

Определение остаточного веса соломы после ее отделения от культуральной жидкости показало наибольшую убыль в вариантах опыта с использованием ассоциацией штаммов *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *Pseudomonas* sp. ИБ G4 (рис.). Разница между ними и контролем на 60 сутки составляла 284 мг или 31%. Меньшая степень разрушения была показана ассоциацией штаммов *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *P. mucilaginosus* ИБ Kar (27% по массе) и чистой культурой *Cellulosomonas* sp. E35 (23% по массе).

По сравнению с пшеничной соломой сухая масса полевых трав лучше поддавалась разложению использованными целлюлозолитическими бактериями. Основные закономерности, обнаруженные ранее в опыте с соломой, прослеживались и в случае с сеном полевых трав. Более высокая скорость разложения субстрата была характерна для ассоциаций микроорганизмов, более активной из них была ассоциация *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *Pseudomonas* sp. ИБ G4. Остаточная масса травы на 60 сутки в вариантах с ассоциацией *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *Pseudomonas* sp. ИБ G4 была на 44%, с ассоциацией *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и

P. mucilaginosus ИБ Kar – на 38%, а с чистой культурой *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 на 29% меньше, чем в контроле.

Таким образом, в результате скрининга были получены две бактериальные ассоциации, способные к активному разрушению пожнивных остатков. Ассоциация штаммов *Cellulosomonas* sp. ИБ E35 и *Pseudomonas* sp. ИБ G4 более эффективно разрушала пшеничную солому и сухую надземную массу злаковых трав. По литературным данным представители видов *Paenibacillus mucilaginosus* и *Pseudomonas koreensis* помимо способности к фиксации атмосферного азота могут обладать другими полезными в сельском хозяйстве свойствами: антигрибной, фосфатмобилизующей, ростстимулирующей активностью [13–15]. Целесообразность использования изучаемых ассоциаций целлюлозоразрушающих бактерий в качестве основы для биопрепарата будет определена после детального изучения у них данных свойств.

Литература

1. Семенов В.М., Ходжаева А.К. Агроэкологические функции растительных остатков в почве // Агрохимия. 2006. № 7. С. 63–81.
2. Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Мифтахова А.М. Литическая активность микромицетов нефтесодержащих почв как один из факторов фитотоксичности // Агрохимия. 2006. № 9. С. 75–81.
3. Глинушкин А.П., Овсянкина А.В., Киселева М.И., Коломиец Т.М. Распространение грибов

рода *Fusarium* Link. на зерновых культурах // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. № 2. С. 19–25.

4. Potthoff M., Dyckmans J., Flessa H., Muhs A., Joergensen R.G. Dynamics of maize (*Zea mays* L.) leaf straw mineralization as affected by the presence of soil and the availability of nitrogen // Soil Biology and Biochemistry. 2005. V. 37, № 7. P. 1259–1266.

5. Еремин Д.И., Ахтямова А.А. Влияние уровня минерального питания на скорость разложения соломы яровой пшеницы в лесостепной зоне Зауралья // Агропродовольственная политика России. 2015. № 2 (38). С. 68–71.

6. Beauchamp C.J., Levesque G., Prevost D., Chalifour F.P. Isolation of free-living dinitrogen-fixing bacteria and their activity in compost containing delinking paper sludge // Biores. Technol. 2006. V. 97, № 8. P. 1002–1011.

7. Cayuela M.L., Mondini C., Insam H., Sinicco T., Franke-Whittle I. Plant and animal wastes composting: Effects of the N source on process performance // Biores. Technol. 2009. V. 100, № 12. P. 3097–3106.

8. Практикум по микробиологии / ред. А.И. Нетрусов. М.: Академия, 2005. 602 с.

9. Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Мухаматдырова С.Р., Логинов О.Н. Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, № 3–5. С. 1637–1640.

10. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematic / E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–177.

11. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10. P. 421.

12. Filonov A.E., Petrikov K.V., Yakshina T.V., Puntus I.F., Vlasova E.P., Nechaeva I.A., Samoylenko V.A. Regimes of separated and combined cultivation of oil-degrading microorganisms of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera // Biotechnology in Russia. 2008. № 6. P. 110–117.

13. Lu J.J., Xue A.Q., Cao Z.Y., Yang S., Hu X.F. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang, China // Annals of Microbiology. 2014. V. 64, № 4. P. 1745–1756.

14. Goswami D., Parmar S., Vaghela H., Dhandhukia P., Thakker J.N. Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) // Cogent Food & Agriculture. 2015. № 1. URL: <https://doi.org/10.1080/23311932.2014.1000714>

15. Rafikova G.F., Korshunova T.Y., Minnebaev L.F., Chetverikov S.P., Loginov O.N. A new bacterial strain, *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a prom-

ising agent for plant pathogen biological control // Microbiology (Mikrobiologiya). 2016. T. 85, № 3. С. 333–341.

References

1. Semenov V.M., Khodzaeva A.K. Agroecological functions of plant residues in soil. Agrokhimiya, 2006, no. 7, pp. 63–81.

2. Kireeva N.A., Bakaeva M.D., Miftakhova A.M. Lytic activity of micromycetes in oil-contaminated soils as a factor of phytotoxicity. Agrokhimiya, 2006, no. 9, pp. 75–81.

3. Glinushkin A.P., Ovsyankina A.V., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M. Distribution of fungi of the genus *Fusarium* Link. on grain crops. Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka, 2018, no. 2, pp. 19–25.

4. Potthoff M., Dyckmans J., Flessa H., Muhs A., Joergensen R.G. Dynamics of maize (*Zea mays* L.) leaf straw mineralization as affected by the presence of soil and the availability of nitrogen. Soil Biology and Biochemistry, 2005, vol. 37, no. 7, pp. 1259–1266.

5. Eremin D.I., Akhtyamova A.A. The influence of the level of mineral nutrition on the decomposition rate of spring wheat straw in the forest-steppe zone of the Trans-Urals. Agroprodovolstvennaya politika Rossii, 2015, no. 2 (38), pp. 68–71.

6. Beauchamp C.J., Levesque G., Prevost D., Chalifour F.P. Isolation of free-living dinitrogen-fixing bacteria and their activity in compost containing delinking paper sludge. Biores. Technol., 2006, vol. 97, no. 8, pp. 1002–1011.

7. Cayuela M.L., Mondini C., Insam H., Sinicco T., Franke-Whittle I. Plant and animal wastes composting: Effects of the N source on process performance. Biores. Technol., 2009, vol. 100, no. 12, pp. 3097–3106.

8. Laboratory manual on microbiology. A.I. Netrusov (ed.). Moscow, Akademiya, 2005. 602 p.

9. Korshunova T.Yu., Chetverikov S.P., Mukhamatdyarova S.R., Loginov O.N. Nitrogenase and oxidative activity of bacteria *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk, 2013, vol. 15, no. 3–5, pp. 1637–1640.

10. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematic E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). Chichester, John Wiley and Sons, 1991, pp. 115–177.

11. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics, 2009, vol. 10, p. 421.

12. Filonov A.E., Petrikov K.V., Yakshina T.V., Puntus I.F., Vlasova E.P., Nechaeva I.A., Samoylenko V.A. Regimes of separated and combined cultivation of oil-degrading microorganisms of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera. Biotechnology in Russia, 2008, no. 6, pp. 110–117.

13. Lu J.J., Xue A.Q., Cao Z.Y., Yang S., Hu X.F. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang, China. *Annals of Microbiology*, 2014, vol. 64, no. 4, pp. 1745–1756.

14. Goswami D., Parmar S., Vaghela H., Dhandhukia P., Thakker J.N. Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth

promoting rhizobacteria (PGPR). *Cogent Food & Agriculture*, 2015, no. 1. Available at: <https://doi.org/10.1080/23311932.2014.1000714>

15. Rafikova G.F., Korshunova T.Yu., Minnebaev L.F., Chetverikov S.P., Loginov O.N. A new bacterial strain, *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a promising agent for plant pathogen biological control. *Mikrobiologiya*, 2016, vol. 85, no. 3, pp. 333–341.

NEW ASSEMBLAGE OF CELLULOLYTIC MICROORGANISMS FOR DECOMPOSITION OF CROP RESIDUES

© D.V. Chetverikova, M.D. Bakaeva, O.N. Loginov

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

In-field decomposition of crop residues serves as a potential source of nutrients and contributes to the formation of humus. To accelerate the humification of stubble, straw and plant tops, one can use cellulose-destroying microorganisms. Since crop residues are poor in nitrogen, the ability of some bacterial species to fix molecular nitrogen may be of help in their microbiological treatment.

With the aim of obtaining new bacterial consortia acting as destructors of crop residues, research was performed on bacterial strains capable of utilizing cellulose as a sole carbon source and growing actively in nitrogen-free environments. Their nitrogenase, cellulolytic activity and rate of wheat straw and weed decomposition were measured in laboratory experiments. Cellulolytic activity of individual strains and bacterial assemblages was evaluated by the ability to destroy carboxymethyl cellulose; a decrease in the kinematic viscosity of carboxymethyl cellulose gel served as a quantitative indicator of its decomposition.

Bacterial assemblages were more active carboxymethyl cellulose destructors. Strains involved in them were identified as *Paenibacillus mucilaginosus*, *Cellulosomonas* sp. and *Pseudomonas* sp. on the basis of cultural-morphological and physiological-biochemical features as well as the nucleotide sequence encoding 16S rRNA subunit. One of bacterial strains *Pseudomonas* sp. IB G4 fixed atmospheric nitrogen, its nitrogenase activity was 0.12 $\mu\text{g N}_2/(\text{ml}\cdot\text{h})$.

The number of microorganisms in the medium with wheat straw and aboveground weed mass reached about 10^8 CFU/ml. The destruction of stem fragments was observed, their microscopy investigation showed tissue maceration. In the case of active bacterial assemblages, the residual mass of wheat straw and weeds decreased by 27–31% and 38–44%, respectively, over 60 days of the experiment.

Thus, as a result of screening, we obtained two bacterial assemblages able to actively destroy crop residues. The assemblage of *Cellulosomonas* sp. strain IB E35 and *Pseudomonas* sp. strain IB G4 were more effective in destroying wheat straw and dry aboveground weed mass.

Key words: cellulolytic microorganisms, crop residues, straw.