

Научная статья
УДК 579.64:579.26:579.25:579.22
EDN: JBQXVQ
DOI: 10.21285/achb.1015



Выявление целлюлозолитической активности штаммов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis*

А.В. Крыжко

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Российская Федерация

Аннотация. Исследование механизмов разложения целлюлозы у штаммов *Bacillus thuringiensis* представляет интерес для поиска новых перспективных продуцентов целлюлаз. Способность Cry3Aa белков *Bacillus thuringiensis* связываться с целлюлазой способствует увеличению стабильности токсинов в кишечнике насекомых. Определение целлюлазной активности проводили качественно при помощи красителя конго красного и количественным методом А.П. Синецына. Скорость разрушения целлюлозы измеряли методом Н.Л. Кристенсена. Ген целлюлазной активности *Bacillus thuringiensis* идентифицировали с помощью специфичных праймеров. Целью данной работы являлось изучение целлюлозолитической активности и детектирование генов целлюлазы в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов. В ходе исследования установлено, что все исследованные штаммы *Bacillus thuringiensis* с коэффициентом подобия, равным 92%, образовывали монофилетическую группу, характеризующуюся высокой степенью гомологии по гену целлюлазы и принадлежащую преимущественно к серотипам *thuringiensis*, *kurstaki* и *dendrolimus*. Максимальная целлюлазная активность, достигающая в среднем 0,25 мкг/мл, характерна для штаммов *Bacillus thuringiensis*, принадлежащих к серотипу *thuringiensis*, а максимальной целлюлозолитической активностью (в среднем до 80%) обладали штаммы, принадлежащие к серотипам *kurstaki* и *thuringiensis*. Подтверждены выраженные целлюлозолитические свойства для штаммов *Bacillus thuringiensis* 685, 792, 800, 926, 942, 989, 072, 0105, 0162, 0307, 0308, 0326, 0371, 0411, 0441, 0452, 0532, 0541, 41H1, 109H10,12-91, 177, 992. Обработка чернозема южного культурой штаммов *Bacillus thuringiensis* 072, 0105, 0326 способствует увеличению целлюлозолитических свойств чернозема южного до 99,5% относительно контроля.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, целлюлаза, ген, серотип, чернозем южный

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0006.

Для цитирования: Крыжко А.В. Выявление целлюлозолитической активности штаммов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2026. Т. 16. N 1. С. 72–81. DOI: 10.21285/achb.1015. EDN: JBQXVQ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Cellulolytic activity of strains of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*

Anastasiia V. Kryzhko

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation

Abstract. Studying the mechanisms of cellulose breakdown in *Bacillus thuringiensis* strains is of interest in the search for potential cellulase producers. Also, the ability of Cry3Aa proteins in *Bacillus thuringiensis* to bind to cellulase increases the stability of toxins in the insect gut. In the study, cellulase activity was determined qualitatively using Congo red dye and quantitatively via a method developed by A.P. Sinitsyn. The rate of cellulose

breakdown was measured employing the Christensen method. The cellulase gene in *Bacillus thuringiensis* was identified using specific primers. The study aimed to examine cellulolytic activity and detect cellulase genes in *Bacillus thuringiensis* strains from the Crimean collection of microorganisms. At a similarity coefficient of 92%, all the examined *Bacillus thuringiensis* strains were found to form a monophyletic group characterized by a high cellulase gene homology, which comprises predominantly the serotypes *thuringiensis*, *kurstaki*, and *dendrolimus*. Maximum cellulase activity, reaching an average of 0.25 µg/mL, was observed in *Bacillus thuringiensis* strains belonging to the *thuringiensis* serotype, while the maximum cellulolytic activity (on average up to 80%) was exhibited by strains belonging to the *kurstaki* and *thuringiensis* serotypes. Pronounced cellulolytic properties were confirmed in the *Bacillus thuringiensis* strains 685, 792, 800, 926, 942, 989, 072, 0105, 0162, 0307, 0308, 0326, 0371, 0411, 0441, 0452, 0532, 0541, 41H1, 109H10, 12-91, 177, and 992. Treatment of southern black earth with the *Bacillus thuringiensis* strains 072, 0105, and 0326 was found to increase its cellulolytic properties up to 99.5% relative to the control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cellulase, gene, serotype, southern black earth

Funding. The work was financially supported by the state assignment no. FNZW-2022-0006.

For citation: Kryzhko A.V. Cellulolytic activity of strains of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2026;16(1):72-81. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.1015. EDN: JBQXVQ.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что целлюлазы играют ключевую роль в почвообразовании и круговороте углерода. В качестве основных родов целлюлозолитических микроорганизмов часто упоминают роды *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Streptomyces* в лесах и *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и *Arthrobacter* в сельскохозяйственных почвах [1]. Аналитическая селекция целлюлозолитических бактерий основана на изучении их способности к гидролизу, для чего анализируется их рост на искусственных целлюлозных средах, а также способностью к окрашиванию конго красным или йодом. Часто прибегают к изучению целлюлолитической активности *in vitro*. Примечательно, что способность бактерий к гидролизу целлюлозы может не совпадать с выработкой ими целлюлозолитических ферментов [2]. Для точного детектирования целлюлозолитических бактерий целесообразно применять элементы геномного анализа. Поскольку целлюлазы имеют важное народно-хозяйственное значение и применяются в различных сферах человеческой деятельности – в медицине при производстве пробиотиков [3], ветеринарии [4], кулинарии, текстильной промышленности, отбеливании, производстве бумаги. Это подчеркивает важность обнаружения новых целлюлолитических штаммов в почве [5, 6].

Целлюлозолитическая активность установлена как для бактерий рода *Bacillus* [7], так и непосредственно для энтомопатогена *Bacillus thuringiensis* [8]. Хотя роль целлюлазы в механизме патогенности *B. thuringiensis* изучена слабо, установлено, что стабильность энтомоцидных белков класса Cry3Aa *B. thuringiensis* в пищеварительной системе личинок и гусениц насекомых зависит от его способности связываться с бактериальной целлюлазой [9]. Целлюлазы *B. thuringiensis*, как и целлюлазы других представителей этого рода, таких как *B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. safensis*, применяются в качестве биоагентов препаратов для компостирования органических отходов [5].

Молекулярно-генетически целлюлаза *B. thuringiensis* исследована недостаточно. Актуальными являются как детекция соответствующего гена у представителей разных штаммов и серотипов энтомопатогенных бактерий, так и исследование его экспрессии под воздействием внешних факторов (состава среды, условий культивирования и пр.).

Целью данной работы являлось изучение целлюлозолитической активности и детектирование гена целлюлазы в штаммах *B. thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперимент и анализ полученных данных проводили на базе лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма (г. Симферополь, Россия). Материалом послужили штаммы *B. thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов данного института, зарегистрированной на сайте Научно-технологической инфраструктуры Российской Федерации¹ под номером 507484.

Определение целлюлазной активности проводили методом Г.Л. Пиньейру, Р.Ф. Корреа (2015) на агаризованной питательной среде на основе казеин-пептона и дрожжевого экстракта с добавлением карбоксиметилцеллюлозы в качестве субстрата. Культуры испытуемых штаммов высевали на поверхность агаровой пластины в виде медальонов и культивировали в течение 7 суток при 27 °C, а затем окрашивали 0,1%-м раствором конго красного и отмывали 1 М раствором хлорида натрия. Зоны гидролиза карбоксиметилцеллюлозы окрашивались в желтый цвет, в то время как зоны, в которых отсутствовал гидролиз, становились ярко-красными [10]. В качестве контроля использовали чашки Петри, засеянные типовыми штаммами-продуцентами целлюлазы *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B-1121 и *Paenibacillus lautus* B-11952, полученными из Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» при Наци-

¹Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации // Скр-rf.ru. Режим доступа: <http://www.ckp-rf.ru> (дата обращения 13.01.2026).

ональном исследовательском центре «Курчатовский институт» – Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Москва, Россия).

Для количественного определения целлюлазы в культуральной жидкости штаммов *B. thuringiensis* полоску фильтровальной бумаги массой 50 мг (1×6 см) помещали в стеклянную пробирку емкостью 15 мл и добавляли 1 мл 0,1 М ацетатного буфера с pH 4,5 или 0,05 М цитратного буфера с pH 4,8. Смесь инкубировали в течение 5–10 мин при 50 °C, добавляли 0,5 мл культуральной жидкости, подогретой до 50 °C. Смесь инкубировали при 50 °C 1 ч, после чего пробирку быстро охлаждали в холодной воде. Количество редуцирующих сахаров определяли против контрольной пробы, приготовленной и обработанной аналогично, но без фильтровальной бумаги. За единицу активности принимали количество фермента, который при действии на бумагу при 50 °C и pH 4,5–4,8 образует 1 мкмоль редуцирующих сахаров в минуту. Количество выделяющихся редуцирующих сахаров определяли методом Шомоди – Нельсона спектрофотометрически при длине волны 640 нм [11].

Скорость целлюлолитических процессов определяли модифицированным лабораторным методом Н.Л. Кристенсена (1981). Для этого отбирали образцы чернозема южного с глубины до 5 см и обрабатывали жидкими культурами штаммов *B. thuringiensis* с титром спор $0,4 \times 10^9$. Навеску 25 г почвы помещали на диск стерильной фильтровальной бумаги с заранее известным весом, размещенный на дне чашки Петри. Между фильтровальной бумагой и исследуемой почвой прокладывали слой тонкой капроновой ткани. Почву увлажняли до 60% от полной влагоемкости и помещали в термостат на 30 суток при температуре 27 °C. Эксперимент проводили в пяти повторностях. По окончании культивирования почву и капроновую ткань удаляли, остатки фильтровальной бумаги просушивали до воздушно-сухого состояния и взвешивали. Степень разложения целлюлозы определяли как разницу между исходной и конечной массой фильтровальной бумаги и выражали ее в процентах от исходной массы² [12].

Для подбора вырожденных праймеров для детекции гена целлюлазы использовали NZ_CP021061.1 из базы NCBI. Длина целевого гена составляет 1268 bp. Идентификацию генов целлюлазной активности штаммов *B. thuringiensis* проводили с помощью праймеров C3F 5'-CAGGAAATGAATGTAAGAGC-3' и C3R 5'-TCTTCTCCCATATTCTGTC-3'. Длина продукта амплификации составляет 409 bp. Объем реакционной смеси составил 25 мкл и включал 5 мкл Screen Mix-HS («Евроген», Россия), содержащей 3 mM MgCl₂ и 0,12 mM дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а также 50 нг дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК). Амплификацию проводили с использованием термоциклера C1000tm Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: 1 мин – начальная денатурация при 95 °C, затем 35 циклов – 30-секундная денатурация при 94 °C, 30 с – отжиг при 54 °C и 1 мин – элонгация при 72 °C, заключительная элонгация – 3 мин при 72 °C. Продукты полимеразной цепной реакции визуализировали

с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с добавлением 5 мкл 1%-го раствора этидиум бромид. В качестве электролитного буфера использовали 5X трис-ацетатный электродный буфер. Размер полученных фрагментов измеряли с использованием программного обеспечения GelAnalyzer 23.1.1.

Нуклеотидные последовательности гена целлюлазы, полученные путем амплификации геномной ДНК штаммов *B. thuringiensis* с примерами C3, определили секвенированием по Сенгеру. Полученные последовательности выравнивали при помощи алгоритма Clustal X. В работе использовали такие методы реконструкции деревьев, как невзвешенная попарная группировка с усреднением (UPGMA), метод ближайшего соседа. При построении дендрограммы использовали метод максимального подобия и модель Тамура – Ней. Последовательности гена целлюлазы штаммов *B. thuringiensis*, полученные из базы NCBI, использовались в качестве референсных [13].

Активность штаммов анализировали с применением кластерного анализа методом *k*-средних, визуализацию описательных статистик проводили при помощи Microsoft Excel 2007 и прикладных статистических пакетов R [14].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция гена целлюлазы, проведенная при помощи пары праймеров C3F и C3R, позволила идентифицировать искомую последовательность в геномах исследуемых штаммов *B. thuringiensis* (рис. 1).

Были определены нуклеотидные последовательности гена целлюлазы, полученные путем амплификации геномной ДНК штаммов *B. thuringiensis* с примерами C3. Полученные данные проанализировали при помощи филогенетического анализа. Все использованные методы (как UPGMA, так и метод ближайшего соседа) позволили реконструировать деревья, характеризующие филогенетические взаимоотношения между штаммами *B. thuringiensis*, основанные на последовательности гена целлюлазы, и установить их одинаковую топологию. Полученное филогенетическое дерево позволило визуализировать основные черты выявленных в результате анализа закономерностей (рис. 2).

Анализ полученного филогенетического древа показал низкую генетическую изменчивость гена целлюлазы в штаммах изученной коллекции. Все штаммы *B. thuringiensis* с коэффициентом подобия, равным 92%, образовывали монофилетическую группу, объединяясь с типовыми штаммами *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* T01001 (ACNA01000078.1), *B. thuringiensis* serovar *berliner* ATCC 10792 (ACNF01000080.1) [15], а также штаммами *B. thuringiensis* GOE2 (LXLG01000022.1) и *B. thuringiensis* GOE3 (LXLH01000033.1). Внутри данной группы выделили два обособленных кластера. Первый, выделившийся с коэффициентом подобия, равным 96%, состоял из референсных и коллекционных штаммов 836, 048, 917, 0304, 810, 888, 708, 854, 949. Второй кластер состоял из штаммов *B. thuringiensis* 0271, 942, 820, 815, 989, 0308, 0279, 41, 072, 926, 902, 800, 994 и 014. Установлено, что, хотя все штаммы *B. thuringiensis*, вошедшие в данную монофилетическую группу, имеют незначительное молекулярное разно-

² Круглов Ю.В. Методические рекомендации по оценке токсического действия пестицидов на микрофлору почвы. Л., 1981. 18 с.

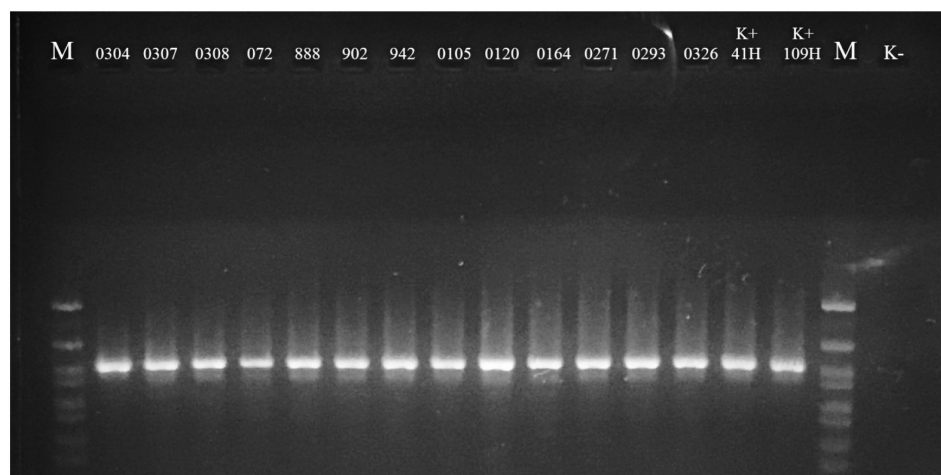


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации с праймерами СЗ (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов; К+41Н и К+109Н – эталонные штаммы *Bacillus thuringiensis* 41 и 109)

Fig. 1. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained by amplification with C3 primers (M – marker of DNA lengths (50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”); the numbers of the studied strains are indicated in the upper line; K+41H and K+109H are the reference strains of *Bacillus thuringiensis* 41 and 109)

образе по гену целлюлазы, они относятся к разным серотипам (преимущественно *thuringiensis*, *kurstaki* и *dendrolimus*).

Исключение составил штамм *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* 98, выделившийся с коэффициентом подобия 74% в отдельную кладу вместе со штаммами *B. thuringiensis* MYBT18246 (CP015351.1) [16] и *B. thuringiensis* CGMCC (BMLD01000001.1) [17]. Известно, что штамм MYBT18246 обладает нематичесидной активностью, а штамм CGMCC был секвенирован в рамках глобального проекта по созданию Глобального каталога микроорганизмов.

Эффективность целлюлозолитических бактерий может быть оценена с помощью качественных и количественных методов определения целлюлозолитической активности. Качественный метод, предполагающий культивирование бактерий на поверхности питательной среды, содержащей только искусственные источники целлюлозы в качестве источника углерода, с последующей визуализацией зоны гидролиза целлюлозного субстрата при помощи красителя конго красного, показал среднюю и высокую активность исследованных штаммов *B. thuringiensis* (рис. 3). Отмечено образование ярко-желтого цвета питательной среды вокруг культур активных целлюлозолитических штаммов микроорганизмов *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B-1121 и *Paenibacillus lautus* B-11952 (+++). Визуально цвет питательной среды вокруг медальонов с культурами исследуемых штаммов *B. thuringiensis* 98, 202, 708, 810, 815, 820, 836, 854, 888, 902, 917, 949, 994, 0304, 0332, 0337, 0361, 0363, 0374, 0376, 0379, 0399, 0465, 0474, 0486, 0493, 0502, 0534, 0544, 0568, 0570, Z-52, 358, 149, 192, 048 после отмывки от красителя указывал на наличие активного гидролиза карбоксиметилцеллюлозы, сопоставимого с активностью контрольных штаммов (+++). Культуры штаммов *B. thuringiensis* 685, 792, 800, 926, 942, 989, 072, 0105, 0162, 0307, 0308, 0326, 0371, 0411, 0441, 0452, 0532,

0541, 41H1, 109H10,12-91, 177, 992 по сравнению с контролем показывали средний уровень активности целлюлазы (++).

Установлено, что штаммы, входящие в первые два филогенетических кластера (см. рис. 1), достоверно отличались между собой по степени целлюлазной активности ($p = 0,00001$). Все штаммы первого кластера характеризовались как способные к активному гидролизу карбоксиметилцеллюлозы (+++), а среди штаммов, отнесенных ко второму кластеру, активных целлюлазообразователей насчитывалось лишь 43%.

Данные, полученные при качественном определении целлюлазной активности, подтвердились и при количественном изучении активности изучаемого фермента методом А.П. Синицына и оказались сопоставимыми с данными о целлюлозолитической активности чернозема южного, обработанного жидкими споровыми культурами изученных 73 штаммов *B. thuringiensis*.

Целлюлозолитические бактерии идентифицировали путем качественной оценки их способности гидролизовать целлюлозу. Этот процесс включает культивирование бактерий на среде, содержащей искусственную целлюлозу в качестве единственного источника углерода, и использование красителей, таких как конго красный или йод, для выявления колоний, способных утилизировать целлюлозу [2]. Некоторые исследователи утверждают, что способность гидролизовать целлюлозу не всегда напрямую связана с выработкой бактериями ферментов целлюлазы [18]. Метод на основе конго красного не дает информации о количестве вырабатываемых ферментов целлюлазы. Напротив, спектрофотометрические методы обеспечивают большую точность за счет количественного определения содержания редуцирующих сахаров с использованием специфических субстратов [19, 20].

Анализ результатов исследования целлюлазной активности штаммов *B. thuringiensis* показал перспективность штаммов *B. thuringiensis* 0271, 0371,

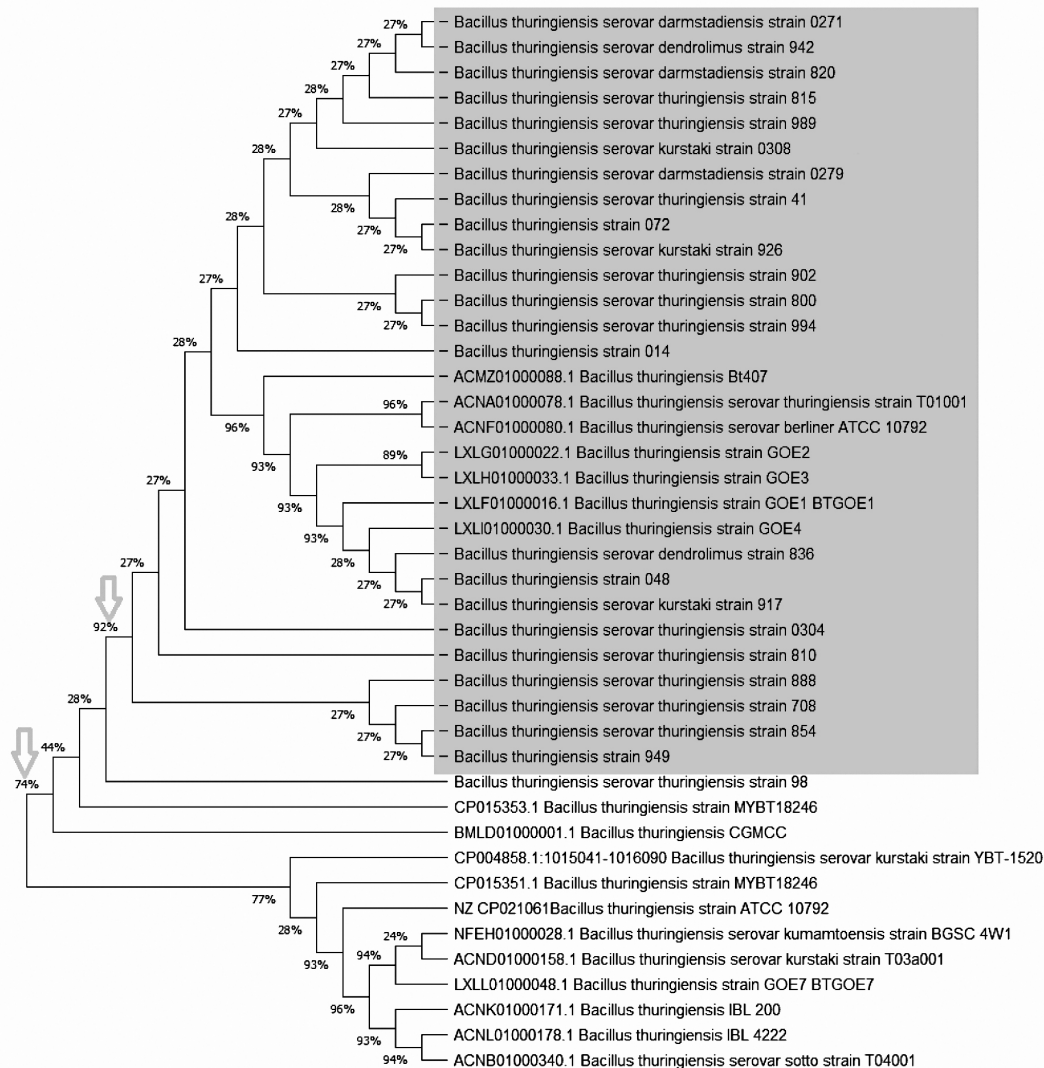


Рис. 2. Филогенетическое дерево последовательностей гена целлюлазы *Bacillus thuringiensis* (филогенетическое дерево получено с помощью метода максимального подобия с применением модели Тамура – Ней из 42 последовательностей; монофилетическая группа, куда входят штаммы *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов, выделена; стрелки указывают на узлы, объединяющие основные монофилетические группировки, цифры у стрелок означают величину статистической поддержки этих узлов)

Fig. 2. Phylogenetic sequence tree of *Bacillus thuringiensis* cellulase gene (the phylogenetic tree was obtained using the maximum similarity method using the Tamura – Ney model of 42 sequences; the monophyletic group, which includes strains of *Bacillus thuringiensis* from the Crimean collection of microorganisms, has been isolated; the arrows indicate the nodes that unite the main monophyletic groupings, the numbers on the arrows indicate the amount of statistical support for these nodes)

800, 810, 888, 787, 926, 994, 989, 0271, 109-С, 0304, 10/Н, 39/Н, 42/Н, 072, 014, 0105.

Особо следует отметить, что при изучении целлюлозолизитической активности штаммов *B. thuringiensis* 815, 820, 994, 0304, 0332, 0337, 0361, 0363, 0374, 0376, 0379, 0399, 0465, 0474, 0486, 0493, 0502, 0534, 0544, 0568, 0570, Z-52, 358, 149, 192, 989, 994 и 0371 в черноземе южном во всех опытных вариантах наблюдали существенную интенсификацию исследуемого показателя, превышающую 50%. В варианте с использованием культуры штаммов 048, 072, 708, 810, 836, 854, 888, 902, 917, 949, 0105, 0304 и 0326 целлюлозолизитическая активность была максимальной и составила в среднем 82,0–93,7% по отношению к контролю (рис. 4).

Все полученные результаты кластеризовались методом *k*-средних в три кластера по степени целлюлозолизитических свойств. В первый кластер вошли штаммы, обладающие высокой (в среднем 0,2 мкг/мл) целлюлазной активностью и способствовавшие высокой целлюлозолизитической активности чернозема южного (в среднем 88,47% по отношению к контролю): 685, 792, 800, 926, 942, 989, 072, 0105, 0162, 0307, 0308, 0326, 0371, 0411, 0441, 0452, 0532, 0541, 41Н1, 109Н10, 12-91, 177, 992. Во второй кластер были объединены штаммы, обладающие высокой целлюлазной активностью (в среднем 0,21 мкг/мл) и способствовавшие увеличению целлюлозолизитической активности чернозема южного (в среднем до 68,8% по отношению к контролю): 98, 202,

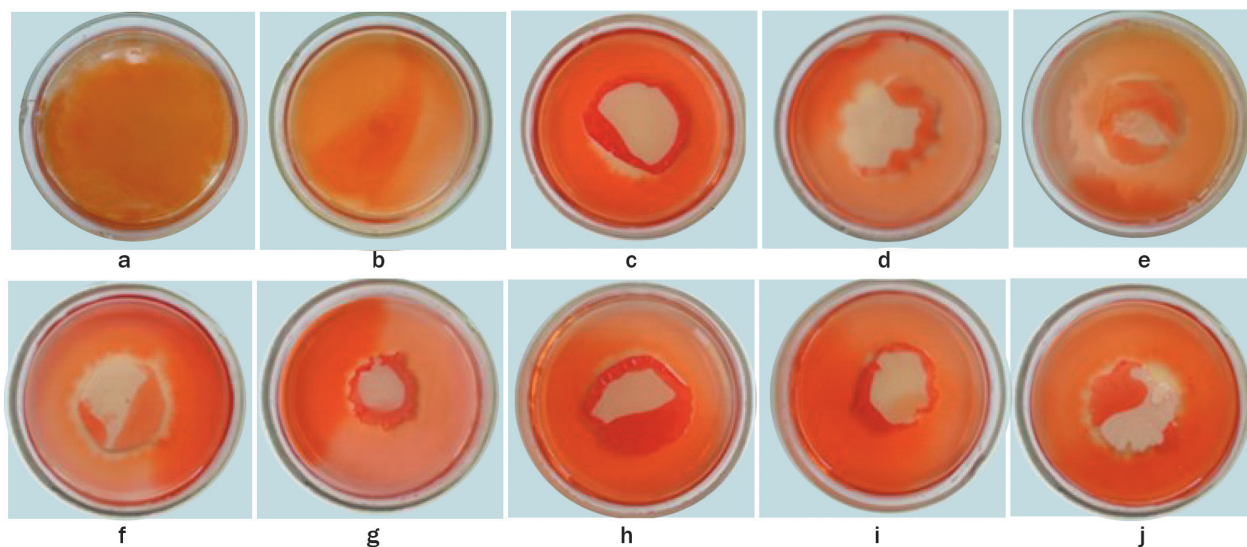


Рис. 3. Целлюлазная активность штаммов *Bacillus thuringiensis* на казеин-пептоновой питательной среде в присутствии карбоксиметилцеллюлозы после обработки красителем конго красным: а – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B-1121; б – *Paenibacillus lautus* B-11952; в – *Bacillus thuringiensis* 0105; д – *Bacillus thuringiensis* 926; е – *Bacillus thuringiensis* 800; ф – *Bacillus thuringiensis* 949; г – *Bacillus thuringiensis* 792; х – *Bacillus thuringiensis* 0493; и – *Bacillus thuringiensis* 0532; ж – *Bacillus thuringiensis* 708

Fig. 3. Cellulase activity of *Bacillus thuringiensis* strains on casein-peptone nutrient medium in the presence of carboxymethylcellulose after treatment with congo red dye: а – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B-1121; б – *Paenibacillus lautus* B-11952; в – *Bacillus thuringiensis* 0105; д – *Bacillus thuringiensis* 926; е – *Bacillus thuringiensis* 800; ф – *Bacillus thuringiensis* 949; г – *Bacillus thuringiensis* 792; х – *Bacillus thuringiensis* 0493; и – *Bacillus thuringiensis* 0532; ж – *Bacillus thuringiensis* 708

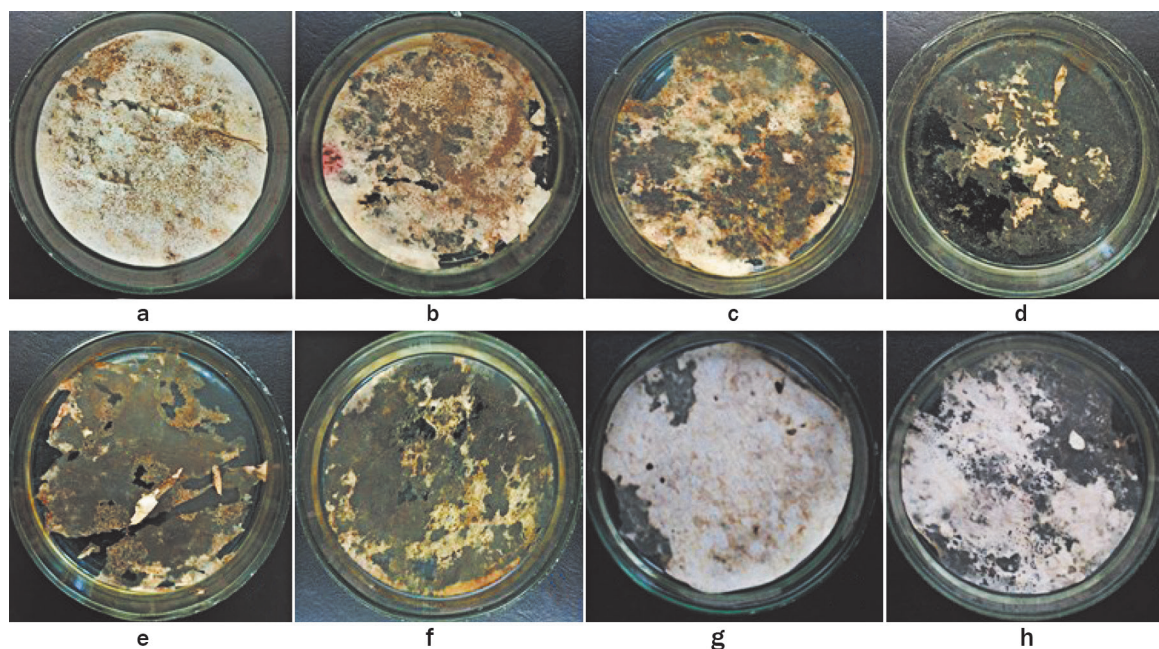


Рис. 4. Целлюлозолитическая активность чернозема южного, обработанного культурами штаммов *Bacillus thuringiensis*: а – контроль (вода); б – *Bacillus thuringiensis* 815; в – *Bacillus thuringiensis* 926; д – *Bacillus thuringiensis* 0105; е – *Bacillus thuringiensis* 072; ф – *Bacillus thuringiensis* 0326; г – *Bacillus thuringiensis* 0361; х – *Bacillus thuringiensis* 0371

Fig. 4. Cellulolytic activity of southern chernozem treated with *Bacillus thuringiensis* strains cultures: а – control (water); б – *Bacillus thuringiensis* 815; в – *Bacillus thuringiensis* 926; д – *Bacillus thuringiensis* 0105; е – *Bacillus thuringiensis* 072; ф – *Bacillus thuringiensis* 0326; г – *Bacillus thuringiensis* 0361; х – *Bacillus thuringiensis* 0371

708, 810, 815, 820, 854, 888, 902, 917, 994, 0332, 0337, 0361, 0363, 0374, 0376, 0379, 0399, 0465, 0474, 0486, 0493, 0502, 0534, 0544, 0568, 0570, Z-52, 358, 149, 192. Третий кластер составили 16 штаммов, имеющие низкую целлюлазную (0,15 мкг/мл) и целлюлолитическую активность (в среднем 40,83% по отношению к контролю). Таким образом удалось выделить наиболее активные штамма *B. thuringiensis* 072, 0105, 0326, обработка которыми способствует увеличению целлюлолитических свойств чернозема южного до 99,5% по отношению к контролю.

Поскольку исследованные штаммы принадлежали к разным серотипам, была осуществлена попытка соотнести активность целлюлазы штаммов *B. thuringiensis* и влияния данной бактерии на целлюлолитическую активность чернозема южного.

Установлено, что максимальная целлюлазная активность, достигающая в среднем 0,25 мкг/мл, оказалась характерной для штаммов *B. thuringiensis*, принадлежащих к серотипу *thuringiensis*. Совокупность штаммов *kurstaki* имеет широкий размах вариации, однако основная часть штаммов данного серотипа имеет целлюлазную активность в пределах 0,19–0,23 мкг/мл. Штаммы *darmstadiensis* и *dendrolimus* продуцировали целлюлазную активность в среднем в пределах 0,185–0,19 мкг/мл.

Целлюлолитическая активность почвы, обработанная жидкими споровыми культурами штаммов *B. thuringiensis*, принадлежащих к разным серотипам, зависит не только от целлюлазной активности самой культуры энтомопатогенных бактерий, но и от их способности вступать во взаимодействие с почвенной микрофлорой

и стимулировать либо, напротив, угнетать рост целлюлолитических микроорганизмов. Максимальной целлюлолитической активностью (в среднем до 80%) обладали штаммы, принадлежащие к серотипам *kurstaki* и *thuringiensis*. Наименьшей целлюлолитической активностью обладали штаммы серотипа *dendrolimus* (до 50%). Группа штаммов с неидентифицированной серотипической принадлежностью оказалась полиморфной по изучаемому признаку.

Для того чтобы определить степень связи между изученными признаками и таксономическим положением (принадлежностью к серотипу) штаммов *B. thuringiensis*, применялся дискриминационный анализ. Общая лямбда Уилкса, вычисленная для данного анализа, составила 0,33, значение F-статистики с числом степеней свободы 11 и 128 равно 11,689; $p < 0,005$, что свидетельствует об удовлетворительной дискриминации. При этом наиболее существенный вклад в разделительную силу модели внесла целлюлазная активность штаммов (0,78 мкг/мл), нежели целлюлолитическая активность почвы (0,42 мкг/мл). Анализ качества классификации и степени неоднородности полученных групп штаммов оценивали путем расчета квадратов расстояний Махаланобиса. Полученные данные позволили заключить, что наибольшие различия можно наблюдать между группами *kurstaki* – *dendrolimus*, *kurstaki* – *darmstadiensis* и *kurstaki* – *thuringiensis*, характеризующимися максимальными расстояниями между центрами групп – 22,77, 15,49 и 13,15 соответственно. Достоверных различий между группами *unidentified* – *thuringiensis* отмечено не было. Данные зависимости представлены в виде диаграммы рассеяния канонических

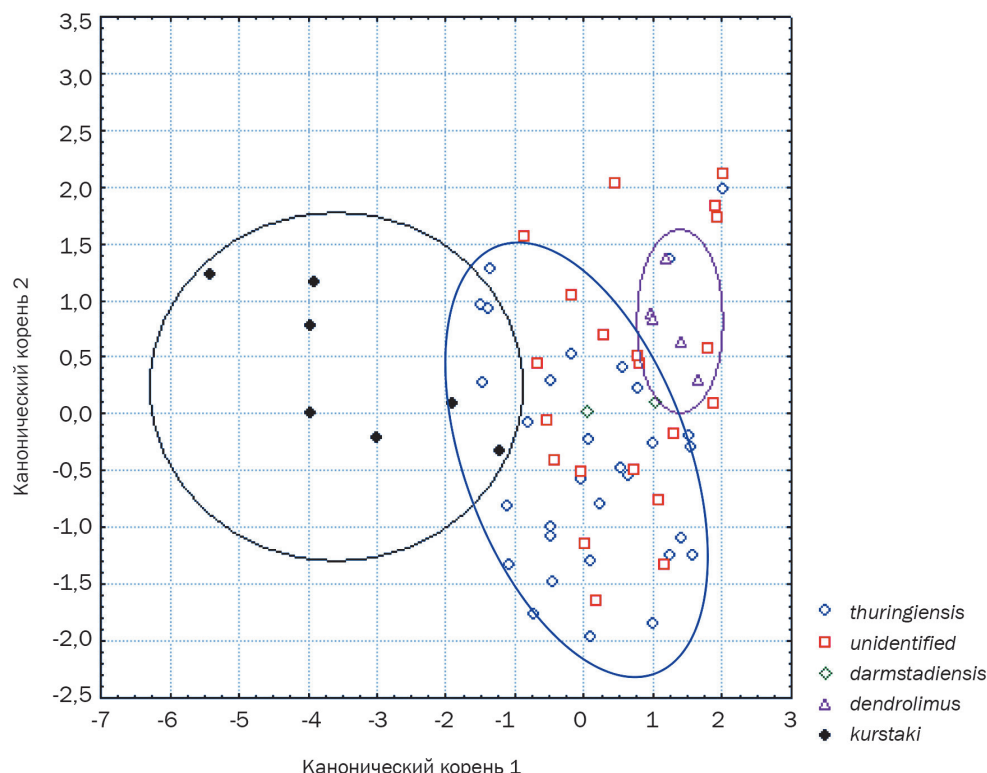


Рис. 5. Диаграмма рассеяния канонических значений целлюлазной активности штаммов *Bacillus thuringiensis* от их целлюлолитической активности для пар значений дискриминантных функций

Fig. 5. Scattering diagram of canonical values of *Bacillus thuringiensis* strains cellulase activity from their cellulolytic activity for pairs of discriminant functions values

значений целлюлазной активности штаммов *B. thuringiensis* от их целлюлозолитической активности для пар значений дискриминантных функций (рис. 5).

Таким образом, установлена тенденция к наличию связи между принадлежностью исследованных штаммов *B. thuringiensis* к серотипам *kurstaki* и *thuringiensis* и наличию у них статистически значимых целлюлозолитических свойств. Вместе с тем показано, что штаммы серотипа *dendrolimus* не только обладали наименьшей целлюлозолитической активностью, но и достоверно дискриминировались от остальных изученных групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы протектирован ген целлюлазы в штаммах *B. thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов. Установлено, что все исследованные коллекционные штаммы *B. thuringiensis* с коэффициентом подобия, равным 92%, образовывали монофилетическую группу, характеризующуюся высокой степенью гомологии по гену целлюлазы и принадлежащую преимущественно к серотипам *thuringiensis*, *kurstaki* и *dendrolimus*.

Установлено наличие целлюлазной активности культуральной жидкости штаммов *B. thuringiensis*.

Показано, что внесение в чернозем южный культуры штаммов *B. thuringiensis* 072, 0105, 0326, способствует увеличению целлюлозолитических свойств почвы до 99,5% по отношению к контролю.

Описана перспективность штаммов *B. thuringiensis* 685, 792, 800, 926, 942, 989, 072, 0105, 0162, 0307, 0308, 0326, 0371, 0411, 0441, 0452, 0532, 0541, 41H1, 109H10, 12-91, 177, 992 как обладающих выраженными целлюлозолитическими свойствами.

Показано, что максимальная целлюлазная активность, достигающая в среднем 0,25 мкг/мл, оказалась характерной для штаммов *B. thuringiensis*, принадлежащих к серотипу *thuringiensis*, а максимальной целлюлозолитической активностью (в среднем до 80%) обладали штаммы, принадлежащие к серотипам *kurstaki* и *thuringiensis*.

Установлена связь между принадлежностью исследованных штаммов *B. thuringiensis* к серотипам *kurstaki* и *thuringiensis* и наличию у них статистически значимых целлюлозолитических свойств. Показано, что штаммы данных серотипов достоверно дискриминировались от остальных изученных групп с расстоянием между центрами групп не менее 13,15.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Trujillo-Cabrera Y., Ponce-Mendoza A., Vásquez-Murieta M.S., Rivera-Orduña F.N., Wang E.T. Diverse cellulolytic bacteria isolated from the high humus, alkaline-saline chinampa soils // *Annals of Microbiology*. 2013. Vol. 63. P. 779–792. DOI: 10.1007/s13213-012-0533-5.
2. Bautista-Cruz A., Aquino-Bolaños T., Hernández-Canseco J., Quiñones-Aguilar E.E. Cellulolytic aerobic bacteria isolated from agricultural and forest soils: an overview // *Biology*. 2024. Vol. 13, no. 2. P. 102. DOI: 10.3390/biology13020102.
3. Liao Y., Wu S., Zhou G., Mei S., Yang Z., Li S., et al. Cellulolytic *Bacillus cereus* produces a variety of short-chain fatty acids and has potential as a probiotic // *Microbiology Spectrum*. 2024. Vol. 12, no. 4. P. e03267–e03223. DOI: 10.1128/spectrum.03267-23.
4. Chen B., Zeng Y., Wang J., Lei M., Gan B., Wan Z., et al. Targeted screening of fiber degrading bacteria with probiotic function in herbivore feces // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2025. Vol. 17. P. 1473–1497. DOI: 10.1007/s12602-024-10215-5.
5. Vasquez E., Millones C. Isolation and identification of bacteria of genus *Bacillus* from composting urban solid waste and palm forest in Northern Peru // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, no. 3. P. 751. DOI: 10.3390/microorganisms11030751.
6. Zhang J., Luo Z., Li N., Yu Y., Cai M., Zheng L., et al. Cellulose-degrading bacteria improve conversion efficiency in the co-digestion of dairy and chicken manure by black soldier fly larvae // *Journal of Environmental Management*. 2023. Vol. 348. P. 119156. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.119156.
7. Chettri D., Verma A.K. Statistical optimization of cellulase production from *Bacillus* sp. YE16 isolated from yak dung of the Sikkim Himalayas for its application in bioethanol production using pretreated sugarcane bagasse // *Microbiological Research*. 2024. Vol. 281. P. 127623. DOI: 10.1016/j.micres.2024.127623.
8. Шмидт К.Н., Худайгулов Г.Г. Выделение новых штаммов-деструкторов целлюлозы, их роль в снижении антропогенной нагрузки на экосистему // *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия «Пищевые и биотехнологии»*. 2016. Т. 4. № 4. С. 54–63. DOI: 10.14529/food160406. EDN: XCNEEL.
9. Guo C.-H., Zhao S.-T., Ma Y., Hu J.-J., Han X.-J., Che J., et al. *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa fused to a cellulase-binding peptide shows increased toxicity against the longhorned beetle // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 93. P. 1249–1256. DOI: 10.1007/s00253-011-3523-9.
10. Pinheiro G.L., Correa R.F., Cunha R.S., Cardoso A.M., Chaia C., Clementino M.M., et al. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica* // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 860. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00860.
11. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов / ред. С.Д. Варфоломеев. М.: Изд-во ВИНТИ, 1990. Т. 25. 150 с.
12. Christensen N.L. Fire regimes in southeastern ecosystems // *Fire regimes and ecosystem properties: Proceedings of the conference (Honolulu, 11–15 December 1978)*. Washington: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, 1981. P. 112–136.
13. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. 2018. Vol. 35, no. 6. P. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
14. Хайлафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований. М.: Ленард, 2014. 320 с.
15. Zwick M.E., Joseph S.J., Didelot X., Chen P.E., Bishop-Lilly K.A., Stewart A.C., et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis* // *Genome*

Research. 2012. Vol. 22. P. 1512–1524. DOI: 10.1101/gr.134437.111.

16. Hollensteiner J., Poehlein A., Spröer C., Bunk B., Sheppard A.E., Rosentstiel P. et al. Complete Genome sequence of the nematocidal *Bacillus thuringiensis* MYBT18246 // *Standards in Genomic Sciences*. 2017. Vol. 12. P. 48. DOI: 10.1186/s40793-017-0259-x.

17. Wu L., Ma J. The Global Catalogue of Microorganisms (GCM) 10K type strain sequencing project: providing services to taxonomists for standard genome sequencing and annotation // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019. Vol. 69, no. 4. P. 895–898. DOI: 10.1099/ijsem.0.003276.

18. Shyaula M., Regmi S., Khadka D., Poudel R. C., Dhakal A., Koirala D., et al. Characterization of thermostable

cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L isolated from the Himalayan soil // *International Journal of Microbiology*. 2023. Vol. 3615757. P. 1–12. DOI: 10.1155/2023/3615757.

19. Chavez Lozano M.V., Catelli E., Sciutto G., Prati S., Genorini E., Mazzeo R. A non-invasive diagnostic tool for cellulose acetate films using a portable miniaturized near infrared spectrometer // *Talanta*. 2023. Vol. 255. P. 124223. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124223.

20. Malik W.A., Javed S. Enhancement of cellulase production by cellulolytic bacteria SB125 in submerged fermentation medium and biochemical characterization of the enzyme // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Vol. 263. P. 130415. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130415.

REFERENCES

1. Trujillo-Cabrera Y., Ponce-Mendoza A., Vásquez-Murrieta M.S., Rivera-Orduña F.N., Wang E.T. Diverse cellulolytic bacteria isolated from the high humus, alkaline-saline chinampa soils. *Annals of Microbiology*. 2013;63:779-792. DOI: 10.1007/s13213-012-0533-5.

2. Bautista-Cruz A., Aquino-Bolaños T., Hernández-Canseco J., Quiñones-Aguilar E.E. Cellulolytic aerobic bacteria isolated from agricultural and forest soils: an overview. *Biology*. 2024;13(2):102. DOI: 10.3390/biology13020102.

3. Liao Y., Wu S., Zhou G., Mei S., Yang Z., Li S., et al. Cellulolytic *Bacillus cereus* produces a variety of short-chain fatty acids and has potential as a probiotic. *Microbiology Spectrum*. 2024;12(4):e03267-e03223. DOI: 10.1128/spectrum.03267-23.

4. Chen B., Zeng Y., Wang J., Lei M., Gan B., Wan Z., et al. Targeted screening of fiber degrading bacteria with probiotic function in herbivore feces. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2025. Vol. 17. P. 1473–1497. DOI: 10.1007/s12602-024-10215-5.

5. Vasquez E., Millones C. Isolation and identification of bacteria of genus *Bacillus* from composting urban solid waste and palm forest in Northern Peru. *Microorganisms*. 2023;11(3):751. DOI: 10.3390/microorganisms11030751.

6. Zhang J., Luo Z., Li N., Yu Y., Cai M., Zheng L., et al. Cellulose-degrading bacteria improve conversion efficiency in the co-digestion of dairy and chicken manure by black soldier fly larvae. *Journal of Environmental Management*. 2023;348:119156. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.119156.

7. Chettri D., Verma A.K. Statistical optimization of cellulase production from *Bacillus* sp. YE16 isolated from yak dung of the Sikkim Himalayas for its application in bioethanol production using pretreated sugarcane bagasse. *Microbiological Research*. 2024;281:127623. DOI: 10.1016/j.micres.2024.127623.

8. Shmidt K.N., Khudaigulov G.G. Isolation of new cellulose destruction strains, their role in the decrease of anthropogenic load to the ecosystem. *Bulletin of South Ural State University, Series "Food and Biotechnology"*. 2016;4(4):54-63. (In Russian). DOI: 10.14529/food160406. EDN: XCNELL.

9. Guo C.-H., Zhao S.-T., Ma Y., Hu J.-J., Han X.-J., Che J., et al. *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa fused to a cellulase-binding peptide shows increased toxicity against the longhorned beetle. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;93:1249-1256. DOI: 10.1007/s00253-011-3523-9.

10. Pinheiro G.L., Correa R.F., Cunha R.S., Cardoso A.M., Chaia C., Clementino M.M., et al. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:860. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00860.

11. Sinitsyn A.P., Chernoglazov V.M., Gusakov A.V. *Methods of study and properties of cellulolytic enzymes*. Moscow: All-Russian Institute of Scientific and Technical Information of the Russian Academy of Sciences; 1990, vol. 25, 150 p. (In Russian).

12. Christensen N.L. Fire regimes in southeastern ecosystems. In: *Fire regimes and ecosystem properties: Proceedings of the conference*. 11–15 December 1978, Honolulu. Washington: U.S. Department of Agriculture, Forest Service; 1981, p. 112-136.

13. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

14. Khalafyan A.A. *Modern statistical methods of medical research*. Moscow: Lenard; 2014, 320 p. (In Russian).

15. Zwick M.E., Joseph S.J., Didelot X., Chen P.E., Bishop-Lilly K.A., Stewart A.C., et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Research*. 2012;22:1512-1524. DOI: 10.1101/gr.134437.111.

16. Hollensteiner J., Poehlein A., Spröer C., Bunk B., Sheppard A.E., Rosentstiel P. et al. Complete Genome sequence of the nematocidal *Bacillus thuringiensis* MYBT18246. *Standards in Genomic Sciences*. 2017;12:48. DOI: 10.1186/s40793-017-0259-x.

17. Wu L., Ma J. The Global Catalogue of Microorganisms (GCM) 10K type strain sequencing project: providing services to taxonomists for standard genome sequencing and annotation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(4):895-898. DOI: 10.1099/ijsem.0.003276.

18. Shyaula M., Regmi S., Khadka D., Poudel R. C., Dhakal A., Koirala D., et al. Characterization of thermostable cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L isolated from the Himalayan soil. *International Journal of Microbiology*. 2023;3615757:1-12. DOI: 10.1155/2023/3615757.

19. Chavez Lozano M.V., Catelli E., Sciutto G., Prati S., Genorini E., Mazzeo R. A non-invasive diagnostic tool for cellulose acetate films using a portable miniaturized

near infrared spectrometer. *Talanta*. 2023;255:124223. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124223.

20. Malik W.A., Javed S. Enhancement of cellulase production by cellulolytic bacteria SB125 in submerged fermentation medium and biochemical characterization

of the enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;263:130415. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130415.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

Вклад автора

Автор выполнил исследовательскую работу,
на основании полученных результатов провел
обобщение, подготовил рукопись к печати.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии
конфликта интересов.

Автор прочитал и одобрил
окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.01.2025.
Одобрена после рецензирования 28.03.2025.
Принята к публикации 15.01.2026.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

Contribution of the author

The author performed the research,
made a generalization on the basis of the results
obtained and prepared the copyright for publication.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read
and approved by the author.*

Information about the article

*The article was submitted 19.01.2025.
Approved after reviewing 28.03.2025.
Accepted for publication 15.01.2026.*