

Synteza celulaz w hodowlach bakterii *Paenibacillus* sp. wyizolowanych z ryzosfery

Jakub Dobrzyński¹, Monika Sitarek⁴, Patrycja Słodownik¹, Urszula Jankiewicz², Dariusz Gozdowski³, Ewa B. Górską¹

1 Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, p.slodownik@onet.pl

2 Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Biochemii

3 Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki

4 Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych

Streszczenie

Z gleby ryzosferowej jabłoni, wiśni i truskawki nawożonej kompostami przygotowanymi na bazie mialu z węgla brunatnego z dodatkiem grzybni *Basidiomycota*, wyizolowano sześć szczepów bakterii względnie beztlenowych, przetrwalnikujących zdolnych do rozkładu celulozy. Na podstawie morfologii, cech biochemicznych i sekwencji 16S rRNA izolaty sklasyfikowano do gatunków z rodzaju *Paenibacillus*. W pożywkach wybiórczych z dodatkiem bibuły filtracyjnej (FP) i karboksymetylocelulozy (CMC) badane izolaty syntetyzowały enzymy, które hydrolizują celulozę amorficzną i krystaliczną. Badane izolaty w 14 i 28-dniowych hodowlach w pożywce z karboksymetylocelulazą (CMC) produkowały odpowiednio od 0 mU do 10,87 mU oraz od 10,73 do 21,13 mU CMCazy (karboksymetylocelulazy). Najwyższą aktywność enzymów scukrzających celulozę (FPazy) w pożywce z CMC wykazano w 14-dniowych hodowlach *P. lautus* EG_11 – 75,6 mU, *Paenibacillus* sp. EG_17 – 57,6 mU oraz *P. woosongensis* EG_15 – 38,9 mU. W pożywce z dodatkiem bibuły filtracyjnej (FP), najwyższą produkcję CMCazy i FPazy odnotowano w hodowlach *P. lautus* EG_11 – odpowiednio 79,85 i 118,83 mU.

Słowa kluczowe

CMCaza, FPaza, *Paenibacillus*

1. Wstęp

Celuloza zbudowana jest z cząsteczek β -D-glukozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi, uformowanymi w tzw. regiony krystaliczne i amorficzne. Obecność regionów krystalicznych warunkuje trudność w rozkładzie celulozy w środowisku

przyrodniczym (Akaracharanya i in. 2014). Enzymy rozkładające celulozę należące do klasy hydrolaz O-glikozydowych są wytwarzane w środowisku przez mikroorganizmy należące do różnych grup systematycznych (Beguin, Aubert 1994). Do bakterii przetrwalnikujących biorących

udział w rozkładzie celulozy w warunkach względnie beztlenowych należą bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Paenibacillus*. Mikroorganizmy te hydrolizują zarówno celulozę krystaliczną, jak i amorficzną dzięki syntezie endo- β -1,4-glukanazy (EC 3. 2. 1. 4), egzoglukanazy, syn. 1,4- β -glukan celobiohydrolazy (EC 3. 2. 1. 91) oraz celobiazazy, syn. β -glukozydazy (EC 3. 2. 1. 21) (Horn i in. 2012).

Strefa przykorzeniowa roślin (ryzosfera) zasiedlana jest licznie przez mikroorganizmy, w tym przez bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Paenibacillus* (Święcicka, Hauschild 1996). Duża różnorodność mikroorganizmów w tej strefie jest determinowana przez wydzieliny korzeniowe, w tym śluz zawierający związki organiczne będące źródłem węgla i energii dla drobnoustrojów. Dodatkowo komórki graniczne korzeni złuszczać się stanowią źródło celulozy, z której mogą korzystać bakterie np. z rodzaju *Paenibacillus* wytwarzające enzymy celulolityczne (Barlow 2003).

Do tej pory wyizolowano z różnych środowisk i opisano wiele przetrwalnikujących bakterii z rodzaju *Paenibacillus* degradowujących celulozę w warunkach *in vivo* i *in vitro*, m.in.: *P. polymyxa* – wcześniej *Bacillus polymyxa* (Fogarty i in. 1973), *P. favisporus* (Velazquez i in. 2004), *P. barcinonensis* (Sanchez i in. 2005), *P. xylanilyticus* (Rivas i in. 2005), *P. curdlanolyticus* (Pason i in. 2006), *P. panacisoli* (Ten i in. 2007), *Paenibacillus thailandensis*, *P. septentrionalis*, *P. nanensis*, *P. montaniterrae* (Khianggam i in. 2009), *P. cellulositrophicus* (Akaracharanya i in. 2009), *P. sacheonensis* (Moon i in. 2011).

W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie zdolnością *Paenibacillus* i *Bacillus* do rozkładu celulozy krystalicznej. Głównym tego powodem jest możliwość wykorzystania celulaz syntetyzowanych przez te bakterie w wielu dziedzinach nauki i przemysłu np. w przemyśle spożywczym, tekstylnym, genetyce, medycynie, czy w biotechnologii (Beukes, Pletschke 2006; Waeonukul i in. 2009).

Celem badań była izolacja bakterii z rodzaju *Paenibacillus* z ryzosfery wybranych roślin i ich identyfikacja oraz

oznaczenie zdolności do syntezy enzymów celulolitycznych.

2. Metody i materiały

Szczepy bakterii wyizolowano ze strefy ryzosferowej wiśni, jabłoni i truskawki, które nawożono kompostami przygotowanymi na bazie miału z węgla brunatnego z dodatkiem grzybni *Basidiomycota* (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*). Rośliny były hodowane na poletkach doświadczalnych założonych w Skierniewicach przez pracowników Wydziałowej Stacji Doświadczalnej. W celu izolacji szczepów 10 g świeżych korzeni wraz z glebą zawieszono w 100 ml soli fizjologicznej (0,85 % NaCl), a następnie wytrząsano przez 20 minut i poddawano pasteryzacji w temp. 85 °C przez 15 minut. Następnie 1 ml zawiesiny wsiewano jałowo do pożywki Park'a (Vardavakis 1989) z FP (bibuła filtracyjna) i inkubowano w temp. 28 °C przez 4 tygodnie. W celu izolacji bakterii 28-dniowe hodowle pasażowano wielokrotnie w pożywce Park'a (ciekłej lub stałej) z dodatkiem lub bez dodatku ekstraktu drożdżowego.

Wstępną identyfikację szczepów przeprowadzono na podstawie obserwacji w mikroskopie świetlnym preparatów trwałych komórek bakterii hodowanych na agarze odżywczym przez 24 godziny w temp. 28 °C oraz sprawdzając ich zdolność do syntezy katalazy. Cechy biochemiczne drobnoustrojów z rodzaju *Bacillus* i *Paenibacillus* badano z zastosowaniem testów API 50 CHB firmy bioMerieux.

Przynależność izolatów do rodzaju oznaczono analizując sekwencję 16S rRNA badanych bakterii. Do analizy zastosowano uniwersalne startery 27F i 1401R. Jako matrycy użyto genomowego DNA wyizolowanego przy użyciu Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) z komórek późnej fazy logarytmicznego wzrostu hodowli bakterii. Oczyszczony produkt PCR został zsekwencjonowany w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównano z sekwencjami

Tabela 1. Wyizolowane szczepy

Zidentyfikowane izolaty (numer akcesyjny)	Najbardziej pokrewne szczepy (numer akcesyjny)
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_8 (AB903906)	<i>Paenibacillus</i> sp. BXC (JQ904538)
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_9 (AB903908)	<i>Paenibacillus</i> sp. Sd-7 (JF508413)
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_11 (AB902952)	<i>Paenibacillus lautus</i> MPF 112 (FN677987)
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_12 (AB903910)	<i>Paenibacillus</i> sp. H28-08 (AM162307)
<i>Paenibacillus woosongensis</i> EG_15 (AB902951)	<i>Paenibacillus</i> sp. SDCB10 (JN617219)
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_17 (AB903911)	<i>Paenibacillus</i> sp. Sd-7 (JF508413)

znajdującymi się bazach w GenBanku/EMBL (European Molecular Biology Laboratory)/DDBJ (DNA Data Bank of Japan) z wykorzystaniem programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Zdolność wyizolowanych bakterii do syntezy celulaz badano w pożywce wg Dubos'a (1928) z zastosowaniem dwóch źródeł celulozy: pasków bibuły filtracyjnej Whatman nr 1 – FP (1×6cm) i 1% roztworu CMC (karboksymetylocelulza). W tym celu do pożywki (6 ml) wsiewano 0,5 ml inokulum badanych izolatów (gęstość 7 w skali McFarlanda) przygotowanego w roztworze soli fizjologicznej (0,85% NaCl). Hodowle założono w sześciu powtórzeniach dla każdego izolatu. Badania wstępne przeprowadzono w pożywce Dubos'a z ekstraktem drożdżowym (0,05%). Produkcję CMCazy i FPazy mierzono po 14 i 28 dniach hodowli w temp. 28°C, metodą spektrofotometryczną (Ghose 1987). Za jednostkę aktywności (U) CMCazy i FPazy przyjęto ilość enzymu, która w warunkach doświadczenia uwalnia ilość cukrów redukujących równoważną 1 μmolowi glukozy uwolnionej w ciągu 1 minuty w warunkach oznaczenia.

Weryfikację wyników badań przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji stosując program Statgraphics plus ver. 4.0. Grupy jednorodnie wyróżniano testem Fishera przy $\alpha=0,05$.

3. Wyniki

Badane izolaty to względnie beztlenowe, przetrwalnikujące bakterie cylindryczne, Gram+, produkujące katalazę, stąd wstępnie oznaczono je do rodzaju *Bacillus* i *Paenibacillus*, natomiast badania molekularne wykazały, że izolaty należą do rodzaju *Paenibacillus* (Tab. 1.).

Badane izolaty asymilowały D-galaktozę, D-glukozę, D-fruktozę, D-mannitol, N-acetyloglukozaminę, eskulinę, D-celobiozę, D-maltozę, skrobię. Natomiast żaden z izolatów nie asymilował: glicerolu, erytrytolu, D-arabinozy, L-ksylozy, D-adonitolu, L-sorbozy, L-ramnozy, dulcytolu, inozytolu, D-sorbitolu, M- α -D-Mannopiranozyd, D-tagtozy, D-fukozy, L-fukozy, D-arabitolu, L-arabitolu, glukonianu potasu, 2-ketoglukonianu potasu, 5-ketoglukonianu potasu (Tab. 2.).

Wszystkie izolaty hodowane w pożywce z dodatkiem CMC wykazały zbliżoną produkcję CMCazy, zarówno w 14 jak i 28 dniu hodowli (Tab. 3.). Produkcja FPazy na tym samym substracie była największa w hodowli 14-dniowej *P. lautus* EG_11, *Paenibacillus* sp. EG_17 i *P. woosongensis* EG_15 (Tab. 4.). Produkcja FPazy po 28 dniach hodowli na CMC *P. lautus* EG_12 i *Paenibacillus* sp. EG_17 była porównywalna i istotnie większa w stosunku do pozostałych szczepów (Tab. 4.).

Tabela 2. Charakterystyka biochemiczna izolatów

L. p.	Cecha biochemiczna	Numer szczepu						L. p.	Cecha biochemiczna	Numer szczepu					
		8	9	11	12	15	17			8	9	11	12	15	17
1	Kontrola	-	-	-	-	-	-	26	Esukulina	+	+	+	+	+	+
2	Glicerol	-	-	-	-	-	-	27	Salicyna	+	-	+	+	+	+
3	Erytrytol	-	-	-	-	-	-	28	D-celobioza	+	+	+	+	+	+
4	D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	29	D-maltoza	+	+	+	+	+	+
5	L-arabinoza	-	+	+	+	+	+	30	D-laktoza	-	+	+	+	+	+
6	D-ryboza	-	+	+	+	+	+	31	D-melibioza	-	+	+	+	+	+
7	D-ksyloza	-	+	+	+	+	-	32	D-sacharoza	-	+	+	+	+	+
8	L-ksyloza	-	-	-	-	-	-	33	D-trehaloza	+	+	-	+	+	+
9	D-adonitol	-	-	-	-	-	-	34	Inulina	-	-	+	-	-	-
10	Metylo-β-D-ksylopiranozyd	-	+	-	-	-	+	35	D-melesytoza	+	-	-	-	-	-
11	D-galaktoza	+	+	+	+	+	+	36	D-rafinoza	-	+	+	+	+	+
12	D-glukoza	+	+	+	+	+	+	37	Skrobia	+	+	+	+	+	+
13	D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	38	Glikogen	+	+	-	+	+	+
14	D-mannoza	-	+	+	+	+	+	39	Ksylitol	-	-	-	-	-	-
15	L-sorboza	-	-	-	-	-	-	40	Gencjobioza	+	-	-	-	-	+
16	L-ramnoza	-	-	-	-	-	-	41	D-turanoza	-	-	-	-	-	+
17	Dulcytol	-	-	-	-	-	-	42	D-liksoza	-	-	-	-	+	-
18	Inozytol	-	-	-	-	-	-	43	D-tagatoza	-	-	-	-	-	-
19	D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	44	D-fukoza	-	-	-	-	-	-
20	D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	45	L-fukoza	-	-	-	-	-	-
21	M-α-D-Mannopiranozyd	-	-	-	-	-	-	46	D-arabitol	-	-	-	-	-	-
22	Metylo-α-D-glukopiranozyd	-	-	-	+	-	-	47	L-arabitol	-	-	-	-	-	-
23	N-acetyloglukozamina	+	+	+	+	+	+	48	Glukonian potasu	-	-	-	-	-	-
24	Amigdalina	+	+	+	+	+	-	49	2-ketoglukonian potasu	-	-	-	-	-	-
25	Arbutyna	-	-	+	-	+	-	50	5-ketoglukonian potasu	-	-	-	-	-	-

Spośród badanych izolatów tylko *P.lautus* EG_11 w hodowli 14 dniowej w pożywce z FP produkował enzymy celulolityczne. Po 28 dniach inkubacji produkcję FPazy na

tym substracie oznaczono dla wszystkich szczepów, z wyjątkiem *P. lautus* EG_9, natomiast CMCazy po 28 dniach inkubacji nie

Tabela 3. Produkcja CMCazy w hodowlach izolatów (w pożywce Dubos'a z ekstraktem drożdżowym i zastosowanymi źródłami celulozy). Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie $\alpha = 0,05$.

Izolaty	Karboksymetyloceluloza		Bibula filtracyjna	
	14- dzień hodowli (mU)	28- dzień hodowli (mU)	14- dzień hodowli (mU)	28- dzień hodowli (mU)
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_8	10,87 b	11,47 a	0 a	0 a
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_9	0 a	10,73 a	0 a	1,25 a
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_11	7,4 ab	18,8 a	70,6 b	79,85 b
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_12	6,73 ab	12,23 a	0 a	0 a
<i>Paenibacillus woosongensis</i> EG_15	9,9 b	21,13 a	0 a	13,36 a
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_17	6,2 ab	16,17 a	0 a	9,48 a
NIR _{$\alpha=0,05$}	8,103	19,593	1,69085	34,091

Tabela 4. Produkcja FPazy w hodowlach izolatów (w pożywce Dubos'a z ekstraktem drożdżowym i zastosowanymi źródłami celulozy) . Różne litery w tej samej kolumnie oznaczają różnice statystycznie istotne na poziomie $\alpha = 0,05$.

Izolaty	Karboksymetyloceluloza		Bibula filtracyjna	
	14- dzień hodowli (mU)	28- dzień hodowli (mU)	14- dzień hodowli (mU)	28- dzień hodowli (mU)
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_8	2,63 a	4,5 a	0 a	1,92 ab
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_9	4,5 a	4,2 a	0 a	0 a
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_11	75,6 c	0 a	118,83 b	10,83 ab
<i>Paenibacillus lautus</i> EG_12	11,53 a	38,5 b	0 a	1,5 ab
<i>Paenibacillus woosongensis</i> EG_15	38,9 b	13,33 a	0 a	0,73 ab
<i>Paenibacillus</i> sp. EG_17	57,55 bc	42,47 b	0 a	2,95 ab
NIR _{$\alpha=0,05$}	24,174	20,549	9,861	10,779

syntetyzowały szczepy *P. lautus* EG_12 i *Paenibacillus* sp. EG_8 (Tab. 3.).

4. Dyskusja

W literaturze istnieje kilka pozycji opisujących szczepy *Paenibacillus* o podobnych cechach biochemicznych do izolatów opisanych przez autorów. Liang i in. (2014) wykazali, że wyizolowany przez nich szczep *Paenibacillus terrae* ME27-1 asymiluje: fruktozę, eskuklinę, D-celozbiozę, D-maltozę, skrobię, natomiast nie wykorzystuje: glicerolu, erytrolu, D-arabinozy, L-sorbozy, L-ramnozy, dulcytolu, inozytolu, D-sorbitolu, ksylitolu, D-tagatozy, D-fukozy, D-arabitolu, co koresponduje z cechami biochemicznymi szczepów wyizolowanych

przez autorów. Natomiast zgodność wyników z wyjątkiem szczepu *Paenibacillus* sp. EG_8 stwierdzono dla: L-arbinozy, D-rybozy, D-mannozy, D-laktozy, D-melibiozy, D-rafinozy. Bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Paenibacillus* badane przez Akaracharanya (Akaracharanya i in.2014) są zdolne do wykorzystywania takich związków jak: eskulina, D-celobioza, D-maltoza, skrobia, glicerol, L-sorboza, L-ramnoza, inozytol, d-sorbitol. Ponadto takie same wyniki z wyjątkiem szczepu *Paenibacillus* sp. EG_8 otrzymano przy związkach: L-arabinoza, D-laktoza, D-melibioza.

Wśród drobnoustrojów celulolitycznych z rodzaju *Paenibacillus* stwierdza się zdolność do hydrolizy celulozy dzięki syntezie

przez nie kompleksu celulazy, który złożony jest z: endoglukanaz, egzoglukanaz i celobiazę (Emtiaz i in. 2007). Większość prac opisująca bakterie z rodzaju *Paenibacillus* dotyczy produkcji endoglukanaz określanej również jako produkcja karboksymetylocelulazy (Akaracharanya i in. 2009; Kumar i in. 2012). Jednak w ostatnim czasie większą uwagę poświęca się badaniom nad produkcją celulaz hydrolizujących regiony krystaliczne celulozy m.in. awicelazie (Subramaniyan, Prema 1999; Waeonukul i in. 2009).

Produkcja celulaz w hodowlach badanych izolatów zależała od źródła celulozy. Szczepy hodowane w pożywce mineralnej z dodatkiem CMC jako źródło węgla produkowały zbliżone ilości CMCazy oscylujące w granicach 0 – 21 mU. Podobne wartości otrzymali Akaracharanya i in. (2014), produkcja CMCazy wyizolowanych przez nich szczepów *Paenibacillus* sp. hodowanych z dodatkiem CMC wynosiła od 1 mU do 8 mU. Natomiast wyższe aktywności enzymów celulolitycznych w hodowlach *Paenibacillus* z dodatkiem CMC stwierdzili Emtiaz i in. (2007). Produkcja CMCazy i FPazy badanych przez nich szczepów *Paenibacillus* sp. E, *Paenibacillus* sp. H i *Paenibacillus* sp. SH oscylowała w granicach od 200 mU do 5000 mU w zależności od czasu trwania hodowli. Na podłożu z dodatkiem FP najwyższą produkcję zarówno FPazy, jak i CMCazy stwierdzono dla szczepu *Paenibacillus lautus* EG_11. Zbliżone wyniki uzyskali we wcześniejszych badaniach (Górską i in. 2001). Wyizolowany przez nich szczep *Bacillus polymyxa* (obecnie *Paenibacillus polymyxa*) hodowany z dodatkiem FP jako źródło celulozy produkował CMCazę w ilości 35 mU/ml. Produkcja CMCazy przez ten szczep jest zbliżona do produkcji szczepu *Paenibacillus lautus* EG_11, która wynosi 23,6 mU. Nieco wyższe wartości syntezy FPazy odnotowali Sharma i in. (2013) w hodowli *P. mucilaginosus* B5. Badany przez nich szczep hodowany z dodatkiem odpadów ligninocelulozowych z *Dandracalamus stritcus* wykazał produkcję FPazy – 480 mU, a z dodatkiem odpadów z *Bobma ceiba* – 504 mU, co jest około

pięciokrotnie wyższą aktywnością od najlepszego szczepu *Paenibacillus lautus* EG_11 – 118,83 mU.

5. Podsumowanie

Z roku na rok zwiększa się ilość odpadów ligninocelulozowych, które do środowiska trafiają wraz z produktami ubocznymi leśnictwa, przemysłu tekstylnego czy rolnictwa (Denisiuk 2008). Odpady te ze względu na ich skład chemiczny w środowisku przyrodniczym mogą ulegać rozkładowi trwającemu niekiedy kilkanaście i więcej lat (Bednarski, Repsa 2001). W związku z powyższym coraz więcej badań prowadzonych jest nad syntezą bakteryjnych i grzybowych enzymów celulolitycznych i ligninolitycznych, które znalazłyby zastosowanie w gospodarce człowieka do utylizacji odpadów ligninocelulozowych lub innego wykorzystania. Wyizolowane przez autorów szczepy bakterii syntetyzują CMCazy i FPazy, dlatego potencjalnie mogą być użyte do przygotowania preparatu enzymatycznego do degradacji odpadów ligninocelulozowych.

Bibliografia

- Akaracharanya A., Lorliam W., Tanasupawat S., Lee K.C., Lee J.S, 2009, *Paenibacillus cellulotrophicus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from Thai soil, Int. J. Syst. Evol. Micr. 59, 2680-2684.
- Akaracharanya A., Taprig T., Sitdhipol J., Tanasupawat S., 2014, *Characterization of cellulase producing Bacillus and Paenibacillus strains from Thai soils*, J. Appl. Pharm. Sci. 4, 6-11.
- Barlow P.W., 2003, *The root cap: Cell dynamics, cell differentiation and cap function*, J. Plant growth Regul. 21, 261-286.
- Bednarski W., Repsa A., 2001, *Food biotechnology*, wyd. WNT, Warszawa.
- Beguín P., Aubert J.P., 1994, *The biological degradation of cellulose* [Review], FEMS Microbiol. Rev. vol. 13, 25-58.
- Beukes N., Pletschke B.I., 2006, *Effect of sulfur-containing compounds on Bacillus cellulosome-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities*, FEMS Microbiol. Lett. 264, 226-231.
- Denisiuk W., 2008, *Straw. The potential of mass and energy*, Agr. Eng, vol. 100, 23-30. (in Polish).

- Dubos R.J., 1928, *The decomposition of cellulose by aerobic bacteria*, J. Bacteriol. vol. 15: 223-234.
- Emtiazi G., Pooyan M., Shamalnasab M., 2007, *Cellulase activities in nitrogen fixing Paenibacillus isolated from soil in n-free media*, World J. Agr. Sci., vol. 3, 602-608.
- Fogarty W.M., Griffin P.L., 1973, *Some preliminary observations on the production and properties of a cellulolytic enzyme elaborated by Bacillus polymyxa*, Biochem. Soci. Trans, vol. 1, 1297-1298
- Ghose T.K., 1987, *Measurement of cellulase activities*, Pure Appl. Chem. vol. 59, 257-268.
- Górska, E., Tudek B., Russel S., 2001, *Degradation of cellulose by nitrogen-fixing strain of Bacillus polymyxa*, Pol. J. Microbiol. vol. 50, 129-137.
- Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H., 2012, *Novel enzymes for the degradation of cellulose*, Biotechnol. Biofuels, vol. 5, 45-57.
- Khianngam S., Akaracharanya A., Tanasupawat S., Lee K.C., Lee J.S., 2009, *Paenibacillus thailandensis sp. nov. and Paenibacillus nanensis sp. nov., xylanase-producing bacteria isolated from soil*, Int. J. Syst. Evol. Micr. vol. 59, 564-568.
- Kumar D., Ashfaque M., Muthukumar M., Singh M., Garg N., 2012, *Production and characterization of carboxymethyl cellulase from Paenibacillus polymyxa using mango peel as substrate*, J. Environ. Biol. vol. 33, 81-84.
- Liang Y.L., Zhang Z., Wu M., Wu Y., Feng J.X., 2014, *Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of china and optimization of cellulase production by Paenibacillus terrae ME27-1*, Biomed Res. Int., 1-13.
- Moon J.C., Jung X.J., Jung J.H., Jung H.S., Cheong Y.R., Jeon C.O., Lee K.O., Lee S.Y., 2011, *Paenibacillus sacheonensis sp. nov., a xylanolytic and cellulolytic bacterium isolated from tidal flat sediment*, Int. J. Syst. Evol. Micr. vol. 61, 2753-2757.
- Pason P., Kyu K.L., Ratanakhanokchai K., 2006, *Paenibacillus curdolanolyticus strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides*, Appl. Environ. Microbiol. vol. 72, 2483-2490.
- Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina, E. Velázquez. 2005. *Paenibacillus phyllosphaerae sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of Phoenix dactylifera*, Int. J. Syst. Evol. Micr., vol. 55, 743-746.
- Sánchez M.M., Fritze D., Blanco A., Spröer C., Tindall B.J., Schumann P., Kroppenstedt R.M., Diaz P., Pastor F.I., 2005, *Paenibacillus barcinonensis sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta.*, Int. J. Syst. Evol. Micr. vol. 55, 935-939.
- Sharma N., Mahajan S., Sharma N., 2013, *Evaluation of different pretreatments versus forest wood waste and its selection as a solid substrate for enhanced cellulase production by Paenibacillus mucilaginous B5*, Asian J. Exp Biol. Sci. vol. 4, 226-236.
- Subramaniyan S., Prema P., 1999, *Cellulase-free xylanases from Bacillus and other microorganisms*, FEMS Microbiol. Lett. vol. 183: 1-7.
- Świącicka I., Hauschild T., 1996, *Genus of Bacillus – occurrence and role in natural environments*, Post. Mikrobiol, vol. 35: 27-41. (in Polish).
- Ten L.N., Sang-Hun B., Wan-Taek I., Larina L.L., Jung-Sook L., Hee-Mock O., Sung-Taik L., 2007, *Bacillus pocheonensis sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic bacterium isolated from soil of a ginseng field*, Int. J. Syst. Evol. Micr. vol. 57, 2532-2537.
- Waeonukul R., Kyu K.J., Sakka K., Ratanakhanokchai K., 2009, *Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the Paenibacillus curdolanolyticus B-6 grown on Avicel under aerobic conditions*, J. Biosci. Bioeng. vol. 107, 610-614.
- Vardavakis E., 1989, *Seasonal fluctuations of aerobic cellulolytic bacteria, and cellulase and respiratory activities in a soil profile under a forest*, Plant Soil, vol. 115, 145-150.
- Velázquez E., de Miguel T., Poza M., Rivas R., Roselló-Mora R., Villa T.G., 2004, *Paenibacillus favisporus sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces*, Int. J. Syst. Evol. Micr. vol. 54, 59-64.

Synthesis of cellulase in the cultures of bacteria *Paenibacillus* sp. isolated from the rhizosphere

Summary

From the rhizosphere soil of apple, cherry and strawberry fertilized with composts on the basis of brown coal fine with the addition of mycelium from *Basidiomycota*, 6 strains of facultative anaerobic, spore-forming and able to degrade cellulose bacteria were isolated. On the basis of morphology and 16S rRNA sequences the isolates were classified into *Paenibacillus* sp. In the selective media supplemented with filter paper (FP) and carboxymethylcellulose (CMC) strains, which synthesize cellulolytic enzymes responsible for the hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose were tested. After 14 and 28 days culture in the medium with CMC tested isolates produced similar amounts of carboxymethylcellulase (CMCase) respectively 0 – 10,87 mU and 10,73 – 21,13 mU. The highest synthesis of the enzyme, which saccharifying of cellulose (FPase) was found in 14-day culture of *P. lautus* EG_11 – 75,6 mU, *Paenibacillus* sp. EG_17 – 57,6 mU and *P. woosongensis* EG_15 – 38,9 mU. In the medium supplemented with FP, the highest synthesis of the CMCase and FPase reported in cultures of *P. lautus* EG_11, it was respectively 79,85 and 118,83 mU.

Key words

CMCase, FPase, *Paenibacillus*