

ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АКТИНОМИЦЕТОВ В ПУСТЫННОЙ ПОЧВЕ МОНГОЛИИ

Ж. Норовсүрэн¹ (Монголия), К. Сапармырадов², М.Н. Филимонова², И.Н. Гаспарян³

¹Институт биологии АНМ,

Улан-Батор, 13330, Монголия

²Институт фундаментальной медицины и биологии, КФУ, г. Казань.

³ФГБНУ «ВНИИ агрохимии им. Д.Н. Прянишникова»

norovsurenji@mas.ac.mn, maria.filimonova@kpfu.ru, irina150170@yandex.ru

Работа выполнена при поддержке проекта координационного департамента по разработке и реализации научно-технической политики, и развитию инноваций Монголии 2022/174 (ШУТБИХХЗ -2022/174), частично в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Пустынные экосистемы являются преобладающей средой обитания экстремальных актиномицетов. Знания об экологии актиномицетов, их идентификация позволяют находить новые антибиотики с особыми оптимумами pH, использовать эти популяции для борьбы с фитопатогенными грибами, биоконтроля и биоремедиации (комплекс методов очистки воды, почвы и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов) и т.д. Цель исследования – изучить и проанализировать экофизиологические особенности экстремотолерантных актиномицетов и выявить культуры, перспективные для биотехнологии и сельского хозяйства. Изучена пустынная почва крайне аридная высокогипсоносная на пролювиальных отложениях из горизонта 10-25 см на Шинэжист сомона Баянхонгорского аймака (pH 8,39) Монголии. Для выделения и дифференциации актиномицетов использованы метод поверхностного посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды, микроскопирование колоний на чашках с питательной средой и другие стандартные методы. В почвах пустынных степей Монголии численность актиномицетов колеблется от сотен до десятков тысяч КОЕ/г почвы в зависимости от типа pH и температуры среды посева. Численность алкалотолерантных форм в этих почвах на порядок выше, чем термотолерантных. Выделено и изучено 73 штамма актиномицетов из пустынной почвы, определены антагонистические свойства и оптимумы их роста. Изложены вопросы устойчивости почвенных актиномицетов к различным факторам среды – pH и температуре. Показано, что в изученных пустынных почвах в составе комплекса доминируют *Streptomyces* серии *Cinereus* *Achromogenes*. Выявлено три штамма *Streptomyces* sp., имеющих антагонистическую активность против фитопатогенного гриба *Cladosporium fulvum*, а также устойчивых к различным факторам среды: pH и повышенной температуре.

Ключевые слова: пустынная почва, почвенные актиномицеты, штаммы, актинобактерии, устойчивость, антагонистическая активность.

Для цитирования: Норовсүрэн Ж., Сапармырадов К., Филимонова М.Н., Гаспарян И.Н. Экофизиологические особенности актиномицетов в пустынной почве Монголии//Плодородие. – 2022. – №6. – С. 101-104. DOI: 10.25680/S19948603.2022.129.26.

Характеристика и выявление экологической роли актиномицетов, способных развиваться в таких почвах, которые раньше считали для них непригодными, поиск продуцентов новых антибиотиков и ферментов с особыми pH-оптимумами, применение популяций актиномицетов для биоконтроля и биоремедиации, борьба с фитопатогенными грибами – все это представляет важные практические задачи, для решения которых необходимы знания экологии актиномицетов с необычными для других мицелиальных бактерий потребностями.

Большинство известных антибиотиков продуцируют представители рода *Streptomyces*, принадлежащего к группе актиномицетов, этот род наиболее изучаемый [26]. Стрептомицеты представлены преимущественно почвенными бактериями, очень устойчивыми к экстремальным условиям, основная роль которых заключается в разложении сложных субстратов и участии в формировании почвенного плодородия [12]. В зависимости от гранулометрического и химического состава почвы:

ее окультуренности, засоленности, характера растительного покрова данные микроорганизмы синтезируют те или иные вещества.

В почвах Монголии изучали рода *Streptomyces* [5, 6, 13-16], исследованию редких родов актиномицетов посвящено много работ [9, 10, 21, 23-25].

Особенностью крайне аридных почв, по сравнению с серо-бурыми пустынными, является их трещиноватость. Исследуемая почва подвергалась периодическому прогреванию до высоких температур. Известно, что на поверхности почв пустынной зоны формируется песчано-щебнистый «панцирь», который может нагреваться в дневное время до 40-60°C [2]. Таким образом, в этих почвах создаются условия, благоприятные для развития термотолерантных актиномицетов.

Цель исследований – проанализировать экофизиологические особенности экстремотолерантных актиномицетов и выявить культуры, перспективные для биотехнологии и сельского хозяйства.

Методика. Объектом исследования была разогреваемая пустынная почва крайне аридная высокогипсоносная на пролювиальных отложениях. Образец отбирали из горизонта почв 10-25 см из Шинэжинст сомона Баянхонгорского аймака (рН 8,39).

Для выделения и дифференцированного учета актиномицетов использовали метод поверхностного посева из разведений почвенных суспензий на плотные питательные среды — среду НВА [19], казеинглицериновую среду и минеральный агар 1 [1, 4]. В селективных среды добавляли нистатин (50 мг/мл) для ограничения роста грибов и налидиксовую кислоту (5 мг/мл) для ограничения роста немиецелиальных бактерий. Посевы инкубировали 10-28 суток при температурах: 28⁰С в одной серии опытов, 37⁰С – в другой, 45⁰С в третьей серии опытов и рН 7,2; 8,0 и 9,2. Для создания указанных значений рН кислотность среды устанавливали с помощью фосфатного буфера [7].

Исследования антагонистического действия выделенных штаммов актиномицетов проводились на тест-наборе *B. megaterium* DSM319, *P. putida* PCL1760, *S. typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma asperellum* T.50, *Fusarium oxysporum* A.1, *Penicillium* sp., *Aspergillum niger* и фитопатогенного гриба *Cladosporium fulvum*.

Предварительную идентификацию актиномицетов проводили при первичном микроскопировании колоний на чашках с питательной средой с последующим выделением чистых культур на овсяном агаре и ISP 2 [1, 27]. Для предварительной идентификации использовали признаки в соответствии с рекомендациями из «Определителя бактерий Берджи» [11]: морфологические (наличие фрагментации мицелия, образование спор в субстратном и/или воздушном мицелии, число спор в цепочках, наличие одиночных спор, спорангиев) и хемотаксономические (присутствие L- или мезо- изомера диаминопимелиновой кислоты (ДАПк) [28] и дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток) [18].

Идентификацию стрептомицетов проводили в соответствии с «Определителем актиномицетов» [1] и «Определителем бактерий Берджи» [11]. Антагонистические свойства, активность оценивали по диаметру зон подавления роста (мм).

Оптимальные и ограничительные для роста культур актинобактерий значения температуры и рН определяли по величине радиальной скорости роста колоний на среде с минеральным агаром 1 [1]. Для выявления термотолерантных актинобактерий температура инкубирования была 20, 25, 28, 37, 42, 45 и 50⁰С, для выявления алкалотолерантных – рН инкубирования был 6,2; 6,5; 7,2; 7,5; 8,0; 8,6; 9,0; 9,2; 9,5 и 10,0. Для создания значений рН среды 6,2; 6,5 использовали цитратно-фосфатную смесь по Мак-Ильвейну.

Для создания значений рН среды 7,2; 7,5; 8,0; 8,6; 9,0 и 9,2 кислотность устанавливали с помощью фосфатного буфера, использовали среды с рН 9,5 и 10,0 кислотность среды устанавливали с помощью боратного буфера [7].

Радиальную скорость роста колоний (Кг) рассчитывали по формуле:

$$K_r = (d_2 - d_1) / (t_2 - t_1),$$

где d_1 и d_2 — диаметр колонии в начальный и конечный моменты измерения, мм; t_1 и t_2 — время начального и конечного измерения, сут.

Опыты проводили в 20 повторностях [7].

Использовали показатели частоты доминирования (отношение числа образцов, в которых род составляет более 50% всех представителей родов актинобактерий, выделяемых на используемых средах, к общему числу проанализированных образцов) [9].

Результаты и их обсуждение. В почвах пустынных степей Монголии численность актиномицетов колеблется от сотен до десятков тысяч КОЕ/г почвы в зависимости от типа рН и температуры среды посева. Численность алкалотолерантных форм в этих почвах на порядок выше, чем термотолерантных (рис. 1, 2).

Ранее в почвах крайне аридной пустынной зоны было обнаружено $3,0 \cdot 10^2 - 2,4 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы актиномицетов при использовании питательной среды с пропионатом натрия. Перед исследованием почву обрабатывали 1 ч при 120⁰С [11].

Термотолерантные актинобактерии были обнаружены в горных почвах штата Уттаранчал в Гималаях [20]. Термофильные и термотолерантные актинобактерии известны в качестве продуцентов многих антибиотиков и других биологически активных веществ [22]. У прокарриот основные температурные точки роста (минимальная, максимальная и оптимальная температуры) значительно варьируют [17]. Термотолерантные актинобактерии, как одноклеточные, так и мицелиальные, в большом количестве выделяют из гипер – аридных почв пустыни Атакама.

Из исследованных почв выделены термотолерантные стрептомицеты, относящиеся к секции *Cinereus* и сериям *Achromogenes*, *Chromogenes*, секции *Imperfectus*. Диапазон температур, пригодных для роста термотолерантных актинобактерий, лежит в области 20-45⁰С, оптимальной для роста является температура 28⁰С.

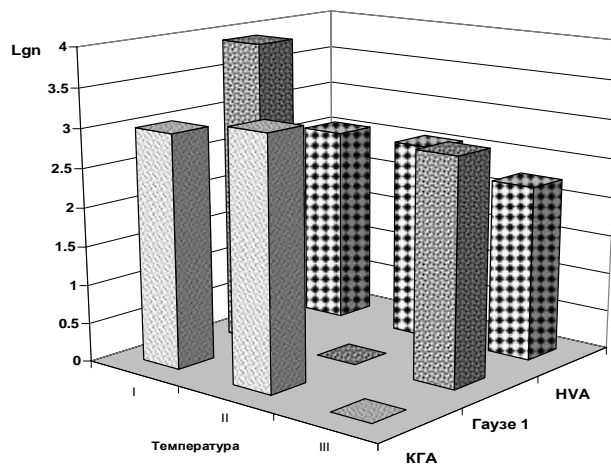


Рис 1. Общая численность термотолерантных актиномицетов на разных средах Lgn (T⁰С): I – 28⁰С, II – 37; III – 45⁰С

Алкалотолерантные стрептомицеты обладают особым механизмом адаптации к условиям повышенного рН, результатом чего является их способность интенсивнее колонизировать щелочную среду, чем нейтральную. Этот механизм позволяет алкалотолерантным формам снижать конкуренцию с нейтрофильными стрептомицетами за нейтральные условия роста и развиваться в условиях щелочных почв.

При исследовании алкалотолерантного почвенного актиномицетного комплекса отмечено, что в почве в составе алкалотолерантных актиномицетов преобладают представители рода *Streptomyces*.

В комплексе алкалотолерантных стрептомицетов, выделяемом на щелочной среде, встречаются виды секции *Cinereus* серий *Achromogenes*, *Chromogenes* и серии *Aureus*, секции *Roseus*, серии *Lavendulae* – *Roseus* и секции *Imperfectus*.

Диапазон значений pH, пригодных для роста алкалотолерантных актиномицетов, лежит в области pH 6,5-9,0, оптимальное для роста значение кислотности – pH 8,0.

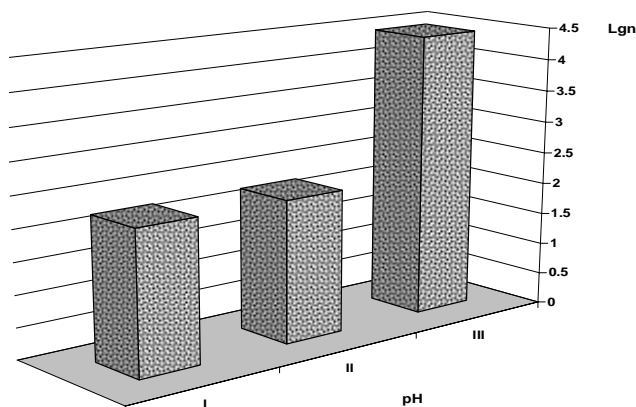


Рис 2. Общая численность алкалотолерантных актиномицетов на среде HVA (pH): I – 7,2, II – 8,0, III – 9,2

Из крайне аридной высокогипсоносной почвы на пролювиальных отложениях был выделен штамм М77 в лаборатории микробиологии Биологического Института АНМ. Штамм М77 характеризуется наличием в клеточной стенке LL-ДАПК (диаминопимелиновой кислоты).

В результате сопоставления установленных нуклеотидных последовательностей гена 16SpPHK с последовательностями аналогичных фрагментов из базы данных актинобактерий *Streptomyces* NCBI выявлено наибольшее сходство изолята М77 и вида *Streptomyces odorifer*. Сходство составляет 98,73%.

Установлено, что изолят М77, выделенный из крайне аридной высокогипсоносной почвы на пролювиальных отложениях и идентифицированный как *Streptomyces odorifer*, подавлял рост следующих тест-организмов: грамположительных и грамотрицательных бактерий *B. megaterium* DSM319, *P. putida* PCL1760, *S. typhimurium*, а также несовершенных микроскопических грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma asperellum* T.50, *Fusarium oxysporum* A.1, *Penicillium* sp. и *Aspergillum niger*. Подавление роста бактерий *L. monocytogenes* отсутствовало.

Из опубликованных данных известно, что споры *Streptomyces odorifer* способны прорасти, а проростки мицелия увеличиваться в длину при низкой влажности воздуха (a_w 0,50). Культуры, выделенные из пустынных почв Монголии, в частности, *Streptomyces achromogenes*, *Micromonospora chalcone* и *Actinodadura aurantiaca*, также более приспособлены к низкой влажности, чем актиномицеты, такие как *A. yumaensis* и *M. niger*, выделенные из почв других типов [3].

В литературе чаще освещаются вопросы, связанные с особенностями вторичного метаболизма экстремотолерантных актинобактерий, с выделением и производством антибиотиков, с образованием щелочеустойчивых ферментов.

Из всех отобранных для исследования актиномицетов три штамма *Streptomyces* sp. показали антагонистическую активность против фитопатогенного гриба *Cladosporium fulvum*. Диаметр зон ингибирования варь-

ировал от 10 до 20 мм. Данный фитопатогенный гриб *C. fulvum* был получен из коллекции микроорганизмов Института Защиты растений Монголии.

Выводы. Экстремотолерантные актиномицеты широко распространены в исследованной пустынной почве Монголии. Выделены представители рода *Streptomyces*, принадлежащего к группе актинобактерий, устойчивые к различным факторам среды: pH, повышенной температуре и обладающие антибиотической активностью.

Литература

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешиникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – М., 1983. – 245 с.
2. Доржготов Д. Почвы Монголии. – Улан-Батор: Admon, 2003. – 287 с.
3. Дорошенко Е.А., Норовсүрэн Ж. Прорастание спор и рост мицелия актиномицетов, выделенных из почв Монголии, при разных уровнях влажности // Бюллетень научных работ БГСХА. – Белгород. Изд-во БелГСХА, 2006. – С. 82 – 83.
4. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты редких родов. – М., 2000. – 81 с.
5. Институт Биологии АНМ. УБ. Наруд дизайн ХХК, 2020. – С. 213-261.
6. Лаборатория микробиологии ИБ АНМ. – УБ, 2018. – С. 10-23.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991. – 340 с.
8. Норовсүрэн Ж. Актиномицеты рода *Streptomyces* в почвах крайнеаридных пустынь. в сб. «Современные проблемы адаптации и разнообразия». – Махачкала: Наука. издат. дом, 2006. – С. 186 – 188.
9. Норовсүрэн Ж. Закономерности географического распространения актиномицетов в почвах Монголии. Монография // УБ.: Изд-во: Мунхийн усэг / 2-е издание, дополненное, переработанное, 2018. – 184 с.
10. Норовсүрэн Ж. Мицелиальные прокариоты рода *Microbispora* в почвах Монголии // Труд БИ. – 2020. – № 36. – С. 174-177.
11. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Под ред. Дж. Хоула и др. – М., 1997. – 800 с.
12. Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И. Органическое вещество почв Российской Федерации. – М.: Наука, 1996. – 253 с.
13. Сборник трудов ИБ АНМ. – УБ, 2002. – С. 104-121.
14. Скалон И.С. Азотфиксирующие микроорганизмы и биологическая активность почв степных и пустынных сообществ в связи с изучением биологической продуктивности растений // Биологическая продуктивность и круговорот химических элементов в растительных сообществах. – Л.: Наука, 1971. – С. 176-181.
15. Скалон И.С., Пурэвдорж Б. Микроорганизмы как важный компонент консорциев южноазиатских биогеоценозов // Ботанический журнал. – 1971. – Т.56. – № 12. – С. 1836-1841.
16. Скалон И.С., Пурэвдорж Б. Микробная характеристика почв пустынно-степного стационара // Структура и динамика пустынно-степных экосистем МНР. – 1979. – С. 34-40.
17. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 2. /Отв. ред. Й. Ленглер, Г. Дрвс, Г. Шлегель. – М., 2005. – 449 с.
18. Hasegawa T., Takizawa M., Takida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1983. – V. 29. – P. 319-322.
19. Hayakawa M., Nonomura H. HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. // Abstracts of papers presented at the annual meeting of the Actinomycetologists. Osaka. Japan. 1984. – P.6.
20. Kumar B., Trivedi P., Kumar Mishra A., Pandey A., Lok Man S. Microbial diversity of soil from two hot springs in Uttarakhand Himalaya // Microbiological Research. 2004. – V. 159. – № 2. – pp. 141-146.
21. Liu S.-W.; Norovsuren J.; Nikandrova A.A.; Osterman I.A.; Sun C.-H. Exploring the Diversity and Antibacterial Potentiality of Cultivable Actinobacteria from the Soil of the Saxaul Forest in Southern Gobi Desert in Mongolia. Microorganisms 2022. 10, p. 989. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050989>.
22. Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics // Antonie van Leeuwenhoek. 2000. – V. 78. – pp.399-405.
23. Javkhlan G. "Taxonomic Characteristics of Actinomycetes from Cultivated Soils of Mongolia," Theses the 9th ISBA, July 10-15. Moscow. pp. 3-20. 1994.
24. Norovsuren J., Liu Shao-Wei., Sun Cheng-Hang., Altansukh B., Dorjsuren Ch. "Molecular and Biological Characteristics of Streptomyces Diversity in the Soils of the Saxaul Forest in Mongolia," Agricultural Science Euro-North-East, 2021. – V. 22, № 1. – pp. 85-92.

25. Tsetseg B., Kudo T., Daram D. and Enkh-Amalan J. "Preliminary Results on Isolation of Actinomycetes of Rare Genera from Mongolian Soils," ISBA'97 Abstract book, Beijing, 1997.
26. RaghavaRao K.V. Antagonistic activities of actinobacteria from mangrove sediment / K.V. RaghavaRao, Ch. Ravikiran, D. BhaskaraRao, Y. Madhavi, P. KoteswaraRao, T. RaghavaRao // Int J Pharm PharmSci. – 2012. – V.4. – № 1. – P.364–367.

27. Shirling E. B., Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology. 1966;16(3):313-340. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
28. Stanek, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to the identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. Appl Microbiol 28, pp. 226–231.

ECOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF ACTINOMYCETES IN THE DESERT SOIL OF MONGOLIA

Norovsuren Zh¹, Saparmyradov K², Filimonova M. N.², Gasparyan I. N.³

¹Institute of Biology, ASM, Ulaanbaatar, 13330, Mongolia

²Institute of Fundamental Medicine and Biology, KFU, Kazan

³Institute of Agrochemistry. D.N. Pryanishnikova, Moscow

e-mail: norovsurenj@mas.ac.mn, maria.filimonova@kpfu.ru, irina150170@yandex.ru

Desert ecosystems are the predominant habitat of extreme actinomycetes. Knowledge about the ecology of actinomycetes, their identification will make it possible to find new antibiotics and enzymes with special pH optima, use these populations to control phytopathogenic fungi, biocontrol and bioremediation (a complex of methods for cleaning water, soil and atmosphere using the metabolic potential of biological objects), etc. The purpose of the research was to study, analyze the ecophysiological features of extremotolerant actinomycetes and identify crops promising for biotechnology and agriculture. The desert soil is extremely arid and highly gypsum-bearing – on proluvial deposits from the soil horizon (10-25 cm) of the Shinezhinst somon of the Bayankhongor aimag (pH 8.39) of Mongolia. To isolate and differentiate actinomycetes, the method of surface seeding from dilutions of soil suspensions on dense nutrient media, microscopy of colonies on cups with a nutrient medium and other standard methods were used. In the soils of the desert steppes of Mongolia, the number of actinomycetes ranges from hundreds to tens of thousands of CFU/g of soil, depending on the type of pH and the temperature of the sowing medium. The number of alkalotolerant forms in these soils is one order of magnitude higher than thermotolerant forms. 73 strains of actinomycetes from desert soil were isolated and studied, antagonistic properties and optima of their growth were determined. The issues of resistance of soil actinomycetes to various environmental factors – pH and temperature are described. It is shown that Streptomyces of the Cinereus Achromogenes series dominate in the studied desert soils as part of the complex. It was revealed that 3 strains of Streptomyces sp. have antagonistic activity against the phytopathogenic fungus Cladosporium fulvum, and are also resistant to various environmental factors: pH and elevated temperature.

Keywords: desert soil, soil actinomycetes, strains, actinobacteria, resistance, antagonistic activity.

УДК 631.81;631.821;631.87

DOI: 10.25680/S19948603.2022.129.27

ВЛИЯНИЕ БИОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА УРОЖАЙНОСТЬ И КАЧЕСТВО ЗЕРНА ЯЧМЕНЯ

А.Н. Налиухин¹, д.с.-х.н., О.А. Власова², к.с.-х.н., А.В. Ерегин²

¹ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 6/17, E-mail: naliuhin@yandex.ru

²ФГБУ ГЦАС «Вологодский»

160555, г. Вологда, Вологодская область, с. Молочное, ул. Студенческая, 11

В двухфакторном полевом опыте на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве установлено, что обработка гранул органоминерального удобрения ОМУ «Универсальное» микробиологическими препаратами Бисолбифит (*Bacillus subtilis* Ч-13) и Фосфатовит (*Bacillus tucilaginosis*) способствует получению урожайности зерна ячменя 28,8 и 30,5 ц/га соответственно. Сбор сырого протеина в вариантах ОМУ + Бисолбифит и ОМУ + Фосфатовит составил 0,30-0,33 т/га. Органоминеральная система удобрения и ОМУ обеспечивали сопоставимую урожайность ярового ячменя, а в 2017 г. урожайность была выше при внесении ОМУ с Бисолбифитом на обоих уровнях кислотности. В целом можно заключить, что применение органоминеральных удобрений может частично заменить классические органоминеральные системы удобрения, особенно при недостаточном внесении навоза, что наблюдается в последние три десятилетия в Нечернозёмной зоне России.

Ключевые слова: полевой опыт, дерново-подзолистая почва, органоминеральное удобрение, микробиологические препараты, ячмень, урожайность.

Для цитирования: Налиухин А.Н., Власова О.А., Ерегин А.В. Влияние биомодифицированных органоминеральных удобрений на урожайность и качество зерна ячменя// Плодородие. – 2022. – №6. – С. 104-108 DOI: 10.25680/S19948603.2022.129.27.

Большое значение в обеспечении сельскохозяйственных предприятий качественным зернофуражным кормом имеет возделывание ярового ячменя. Эта культура требовательна к плодородию почвы и хорошо отзывается на внесение удобрений и известкование кислых почв [8].

Дерново-подзолистые почвы, в силу особенностей генезиса, имеют неблагоприятные для возделывания

ячменя агрохимические свойства, улучшить которые можно за счет применения научно обоснованных систем удобрения и химической мелиорации. Результаты многолетних опытов доказывают, что возможно получение хорошей урожайности зерна ячменя высокого качества и на дерново-подзолистых почвах Нечерноземья [9, 15, 17, 18].