

УДК 579.87

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ
РОДА *Streptomyces*, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ ПОЧВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН,
И ИХ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ**

*Ч. Болормаа, Н. Абдул Ахмад, Г.Д. Кадырова, А.В. Панкова,
В.Г. Евтюгин, Ф.К. Алимова*

Из разных типов почв Республики Татарстан было выделено 261 изолятов рода *Streptomyces*, отнесенных к различным видам по морфологическим параметрам. 12 отобранных штаммов были проанализированы на гидролазную активность, для этого они культивировались на средах с различными источниками углерода и азота. Наибольшая гидролизная активность наблюдалась у *S. achromogenes* на крахмало-аммиачной среде при индукторе клеточных стенок *Fusarium oxysporum*.

Ключевые слова: *Streptomyces* spp., хитиназная активность, глюконазная активность, протеазная активность, *Fusarium* spp.

Введение

Актиномицеты являются нитчатыми грамположительными бактериями, принадлежащими к типу актинобактерий, которые представляют крупнейшую таксономическую единицу [1].

Актиномицеты широко распространены в наземных и водных экосистемах, особенно в почве, и участвуют в переработке огнеупорных биоматериалов путем разложения сложных смесей полимеров мертвых растений, животных и микроорганизмов. Кроме того, актиномицеты играют важную роль в биodeградации почвы и образовании гумуса. Эти организмы обладают разнообразными физиологическими метаболическими свойствами, такими как выработка внеклеточных ферментов. Из 23000 зарегистрированных биологически активных вторичных метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, более 10000 соединений производится актиномицетами, что составляет 45% всех биологически активных метаболитов микробного происхождения [2].

Одним из основных представителей группы актиномицетов является род *Streptomyces*, который представляет важный практический интерес как продуцент антибиотических и других биологически активных веществ, имеющих широкое применение в биотехнологическом производстве. Кроме того, *Streptomyces* продуцируют ферменты биоконтроля фитопатогенных грибов, к которым относятся хитиназы, протеазы, глюканы. Эти метаболиты действуют синергически, усиливая антагонистическую активность актиномицетов, что позволяет использовать их в производстве препаратов для защиты растений [3, 4].

Streptomyces выявлены во всех известных почвах мира, однако их численность, роль в биоценозах, биохимическая активность изменяются в зависимости от эколого-географических условий.

Экологические особенности почвенных актиномицетов в природных экосистемах Татарстана остаются почти неизученными. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование биологической активности видов рода *Streptomyces*, выделенных из почв Республики Татарстан (РТ).

Материалы и методы

В работе были проанализированы образцы следующих типов почв: черноземы, дерново-подзолистые, серо-лесные почвы и погребенные почвы РТ.

Выделение актиномицетов из почвенных образцов и дальнейшее культивирование проводилось на овсяной [5] и органической [6] средах.

Предварительную идентификацию актиномицетов проводили с помощью первичного микрокопирования колоний на чашках с питательной средой [6].

Для видовой идентификации использовали определитель актиномицетов Гаузе с соавторами [7], основанный на анализе морфологических параметров. Для этого актиномицеты выращивали на предметных стеклах с последующим микрокопированием. Каждые 5-е сутки культивирования наблюдали морфологические изменения при помощи световой микроскопии с использованием фазово-контрастного устройства.

Проводили также сканирующую электронную микроскопию агаровых блоков с выросшим 7-суточным мицелием актиномицетов. Для этого колонии актиномицетов фиксировали в 1.25%-ном растворе глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) при 4 °С в течение 5 сут; трижды отмывали в 1%-ном растворе OsO₄ в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) в течение 10 мин при 20 °С. После обезвоживания материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. После высушивания образцы закрепляли, напыляли смесь платины и палладия (IB-3 Ion Coater) и получали снимки с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-405A на кафедре зоологии беспозвоночных и функциональной гистологии Казанского федерального университета.

Табл. 1

Питательные среды с различными источниками азота и углерода

Гаузе 2	Глюкозо-аммиачная	Крахмало-аммиачная
Глюкоза – 10 г	Глюкоза – 10 г	Крахмал – 10 г
Пептон – 5.0 г	NH ₂ SO ₄ – 2 г	NH ₂ SO ₄ – 2 г
Триптон – 30 г	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄
Вода – 1000 мл	MgSO ₄ ·7H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O
рН 7–7.2	FeSO ₄ ·7H ₂ O	FeSO ₄ ·7H ₂ O
	CaCO ₃	CaCO ₃
	NaCl	NaCl
	Вода – 1000 мл	Вода – 1000 мл
	рН 7–8	рН 7–8

Для изучения гидролазной активности изолятов актиномицеты выращивались на средах с разными источниками азота и углерода (табл. 1).

Хитиназную активность измеряли с помощью метода Миллера [8], глюконазную активность – по стандартному методу Конига [9], протеазную активность – по методу Галстяна [10].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010. Использовали дисперсионный анализ. Для сравнения нескольких групп между собой применяли критерий Стьюдента. Кроме того, были проведены регрессионный и корреляционный анализы. Уровень значимости, примененный в работе, равен $p < 0.05$ [11].

Результаты и их обсуждение

1. Идентификация исследуемых актиномицетов. В ходе работы было выделено 261 изолятов актиномицетов из почв РТ (рис. 1; табл. 2).



Рис. 1. Места отбора образцов почв

По морфологическим признакам нами было идентифицировано 12 видов актиномицетов, наиболее распространенным из которых оказался вид *S. achromogenes* (25 изолятов). *S. wedmerensis* был на втором месте по распространенности (24 изолята), а на третьем – *S. cinereoruber* (12 изолята). Далее следуют *S. purpeofuscus* (9 изолятов), *S. mediolani* (7 изолятов), *S. griseolus* (5 изолята), *S. viridogenes* (4 изолята), *S. naganashi* (3 изолята), *S. globisporus* (2 изолята) и *S. olivovariabilis* (1 изолят).

Принадлежность изолятов к роду *Streptomyces* предварительно определяли по следующим показателям: наличие вегетативных гиф (диаметром 0.5–2.0 мкм) и наличие цепочек из нескольких неподвижных спор на воздушном мицелии (рис. 2).

Табл. 2

Идентифицированные изоляты

Название места	Тип почвы	Выделенные актиномицеты		
		Секция	Серия	Вид
Елабужское лестничество	Дерново-подзолистая	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	<i>S. olivovariabilis</i>
Елабужское лестничество	Дерново-подзолистая	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	<i>S. achromogenes</i>
Елабужское лестничество	Дерново-подзолистая	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	<i>S. purpeofuscus</i>
Балтасинский район	Серо-лесная	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	<i>S. viridogenes</i>
Черемшанский район	Чернозем	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	<i>S. griseolus</i>
Балтасинский район	Серо-лесная	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	<i>S. wedmorensis</i>
Алексеевский район	Погребенная	<i>Cinereus</i>	<i>Violaceus</i>	<i>S. cinereoruber</i>
Балтасинский район	Серо-лесная	<i>Cinereus</i>	<i>Violaceus</i>	<i>S. griseoruber</i>
Елабужское лестничество	Дерново-подзолистая	<i>Cinereus</i>	<i>Violaceus</i>	<i>S. naganishi</i>
Черемшанский район	Чернозем	<i>Cinereus</i>	<i>Violaceus</i>	<i>S. violaceochromogenes</i>
Алексеевский район	Погребенная	<i>Helvolo-Flavus</i>	<i>Helvolus</i>	<i>S. mediolani</i>
Черемшанский район	Чернозем	<i>Helvolo-Flavus</i>	<i>Helvolus</i>	<i>S. globisporus</i>

Ферменты актиномицетов рода *Streptomyces* широко используются в фармацевтической промышленности [12] и сельском хозяйстве [13], так как являются активными продуцентами гидролитических ферментов, в особенности хитиназ, глюконаз и протеаз [14, 15].

В ходе работы была изучена гидролитическая активность 12 штаммов разных видов актиномицетов на трех питательных средах: крахмало-аммиачной, глюкозо-аммиачной и среде Гаузе 2.

Хитиназную активность актиномицетов определяли на средах, содержащих в одном случае клеточные стенки гриба *Fusarium oxysporum* (0.5%), а в другом – коллоидный хитин в качестве индукторов ферментов биоконтроля.

При использовании в качестве субстрата для ферментативной реакции клеточных стенок *F. oxysporum* наибольшую активность проявили виды *S. globisporus* (8.612 мМ/мг·мин), *S. achromogenes* (7.824 мМ/мг·мин) и *S. violaceochromogenes* (7.483 мМ/мг·мин) на крахмало-аммиачной среде (рис. 3, а).

При использовании в качестве субстрата коллоидного хитина наибольшую активность проявили виды *S. griseolus* (3.824 мМ/мг·мин), *S. griseoruber* (3.229 мМ/мг·мин), и *S. wedmorensis* (3.577 мМ/мг·мин) на крахмало-аммиачной среде (рис. 3, б).

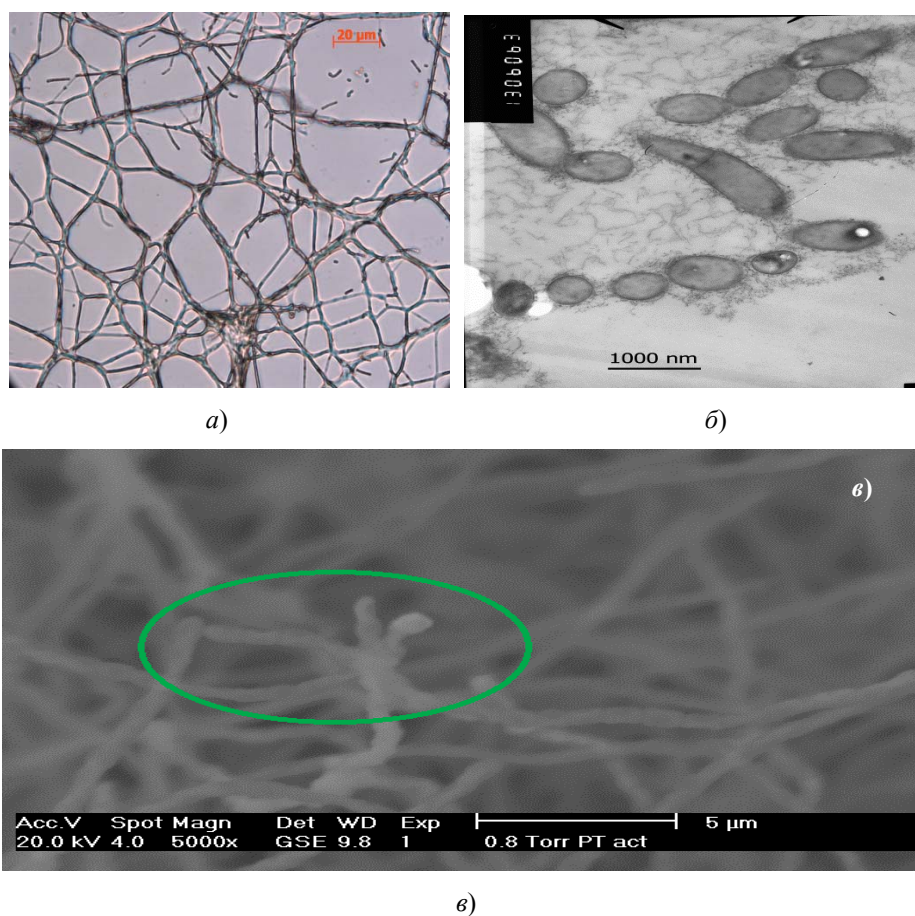


Рис. 2. Цепочки спор у представителей рода *Streptomyces*: воздушный и субстратный мицелии в световом микроскопе (а), споры в электронном микроскопе (б), спороносец в сканирующем микроскопе (в)

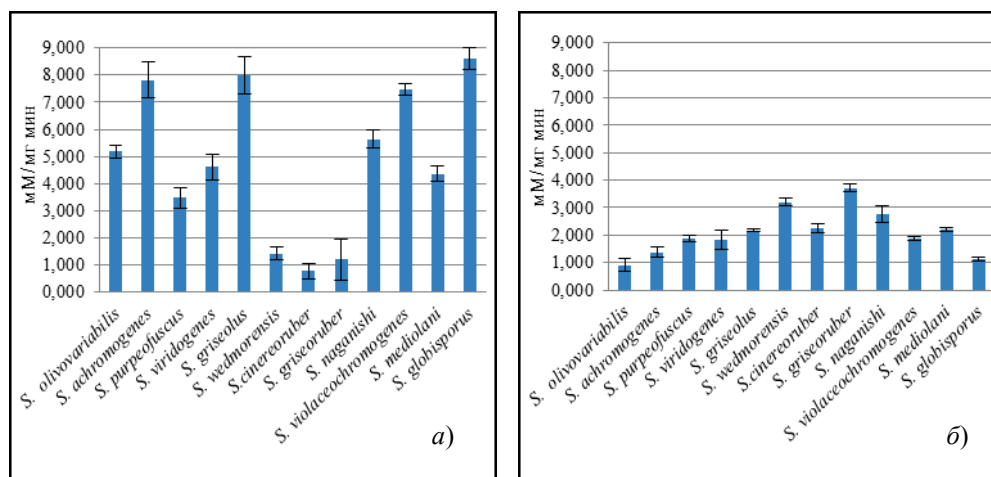


Рис. 3. Хитиназная активность актиномицетов: а – субстрат клеточная стенка, б – субстрат коллоидный хитин

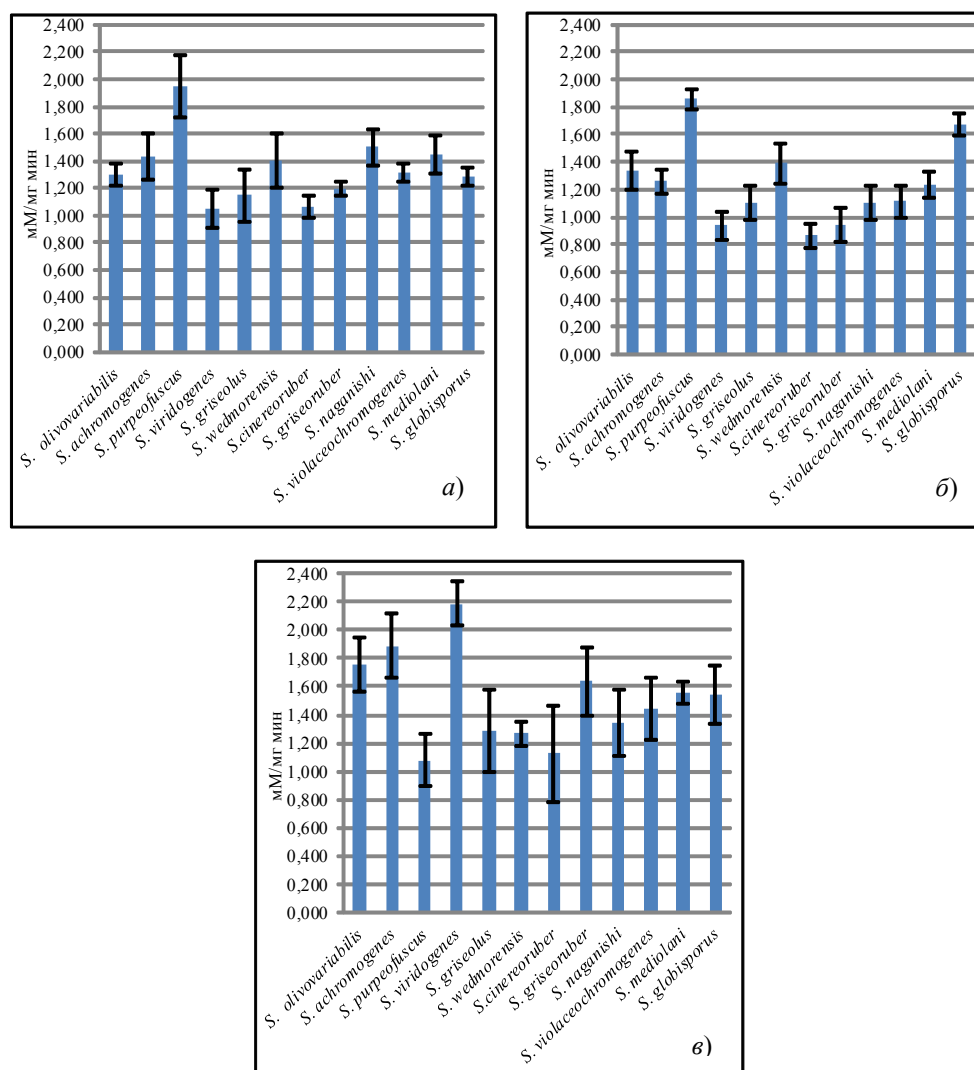


Рис. 4. Протеазная активность актиномицетов на среде Гаузе 2 (а), глюкозо-аммиачной среде (б) крахмало-аммиачной среде (в)

Полученные на среде Гаузе 2 и глюкозо-аммиачной среде значения хитиназной активности были недостоверны.

При анализе протеазной активности изучаемых штаммов на среде Гаузе 2 максимальные значения наблюдались у видов *S. purpeofuscus* (1.950 мМ/мг·мин), *S. naganashi* (1.504 мМ/мг·мин), *S. wedmorensis* (1.406 мМ/мг·мин) (рис. 4, а).

Наибольшая активность протеазной активности на глюкозо-аммиачной среде проявилась у штаммов *S. purpeofuscus* (1.859 мМ/мг·мин), *S. globisporus* (1.670 мМ/мг·мин), *S. wedmorensis* (1.390 мМ/мг·мин) (рис. 4, б).

На крахмало-аммиачной среде максимальная активность отмечена у *S. viridogenes* (2.186 мМ/мг·мин), *S. achromogenes* (1.889 мМ/мг·мин), *S. griseoruber* (1.636 мМ/мг·мин), *S. mediolani* (1.556 мМ/мг·мин) (рис. 4, в).

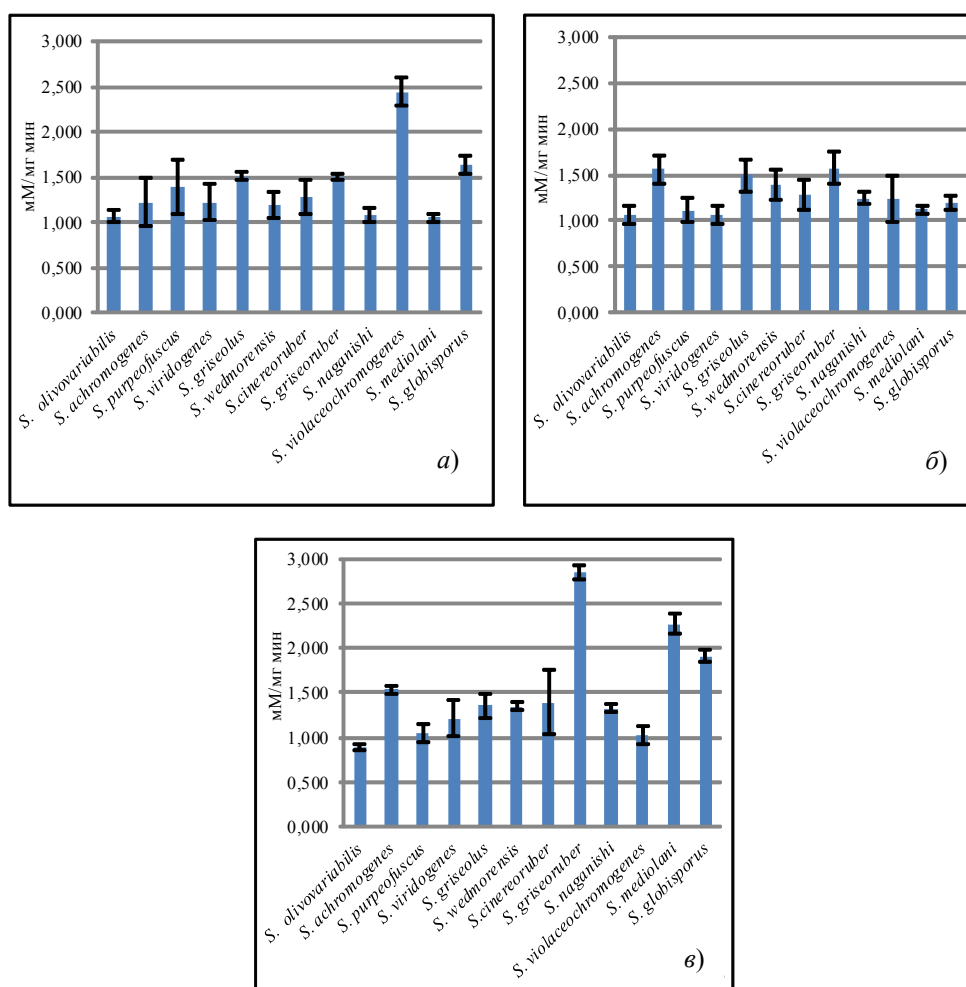


Рис. 5 Глюканазная активность актиномицетов на среде Гаузе 2 (а), глюкозо-аммиачной среде (б), крахмало-аммиачной среде (в)

Далее проводился анализ глюканазной активности 12 изолятов актиномицетов. На среде Гаузе 2 наибольшую активность проявил *S. violaceochromogenes* (2.443 мМ/мг·мин) (рис. 5, а), на глюкозо-аммиачной среде – *S. achromogenes* (1.562 мМ/мг·мин) и *S. griseolus* (1.496 мМ/мг·мин) (рис. 5, б).

Штаммы *S. griseoruber* (2.848 мМ/мг·мин), *S. mediolani* (2.272 мМ/мг·мин), *S. globosporus* (1.911 мМ/мг·мин) проявили максимальную глюканазную активность на крахмало-аммиачной среде (рис. 5, в).

Таким образом, из почв РТ было выделено 268 изолятов актиномицетов, которые были отнесены к 12 видам рода *Streptomyces*. Было отмечено преобладание представителей секции *Ginereus* и *Helvolo-Flavus* во всех типах почв. У вида *S. achromogenes* на крахмало-аммиачной среде при индукторе клеточных стенок *F. oxysporum* наблюдалась наибольшая гидролизная активность.

Литература

1. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2007. – V. 71, No 3. – P. 495–548.
2. Valli S., Suvathi S.S., Aysha O., Nirmala P., Vinoth K.P., Reena A. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2012. – V. 2, No 6. – P. 469–473.
3. Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G., Nilanjan D. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens // *Eur. J. Exp. Biol.* – 2012. – V. 2, No 1. – P. 163–173.
4. Pandey A., Ali I., Butola K.S., Chatterji T., Singh V. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from soil and evaluation of antibacterial activities of *Actinomycetes* against pathogens // *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* – 2011. – V. 2, No 4. – P. 384–392.
5. Waksman S.A., Lechevalier H. The actinomycetes. V. III. – Baltimore, USA: The Williams and Wilkins Co, 1962. – 438 p.
6. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты редких родов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2000. – 81 с.
7. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешиникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – М.: Наука, 1983. – 245 с.
8. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Anal. Chem.* – 1959. – V. 31, No 3. – P. 426–428.
9. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, beta-glucanase, and cellulase activity // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 374, No 1. – P. 80–87.
10. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука. – 2005. – 252 с.
11. Акберова Н.И. Описательная статистика. Интервальные оценки: Учебно-методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии». – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – 40 с.
12. Genilloud O., González I., Salazar O., Martín J., Tormo J.R., Vicente F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 38, No 3. – P. 375–389.
13. Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L., Beaulieu C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth // *Phytoprotection.* – 2002. – V. 82, No 3. – P. 85–102.
14. Narayana K.J.P., Vijayalakshmi M. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277 // *Braz. J. Microbiol.* – 2009. – V. 40, No 10. – P. 725–733.
15. Neurath H. The diversity of proteolytic enzymes // *Proteolytic Enzymes: A practical approach* / Eds. R.J. Beynon, J.S. Bond. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1989. – P. 1–13.

Поступила в редакцию
29.06.12

Болормаа Чулуун – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: chboloroo0809@yahoo.com

Абдул Ахмад Нури – студент кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: abdulahmadnoori@yandex.ru

Кадырова Гузель Дамировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ БНК, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: *gjuzelka@gmail.com*

Панкова Анна Викторовна – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: *pankova.anya@gmail.com*

Евтюгин Владимир Геннадьевич – кандидат биологических наук, ассистент кафедры зоологии беспозвоночных и функциональной гистологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: *vevtugyn@gmail.com*

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: *farida_alimova@hotmail.com*

* * *

BIODIVERSITY OF ACTINOMYCETES OF THE GENUS *Streptomyces* ISOLATED FROM SOIL IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN AND THEIR ENZYME ACTIVITY

Ch. Bolormaa, N. Abdul Ahmad, G.D. Kadyrova, A.V. Pankova, V.G. Evtugin, F.K. Alimova

Abstract

From the various types of soil in the Republic of Tatarstan, we selected 268 isolates of actinomycetes of the genus *Streptomyces* and divide them into different types according to morphological parameters. Twelve selected strains were analysed for hydrolase activity. For this purpose, they were cultivated in media with different sources of carbon and nitrogen. The highest hydrolytic activity was observed in *S. achromogenes* in a starch-ammoniac medium in the presence of a cell-wall inducer *Fusarium oxysporum*.

Keywords: *Streptomyces* spp., chitinase activity, gluconase activity, protease activity, *Fusarium* spp.

References

1. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007, vol. 71, no. 3, pp. 495–548.
2. Valli S., Suvathi S.S., Aysha O., Nirmala P., Vinoth K.P., Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012, vol. 2, no. 6, pp. 469–473.
3. Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G., Nilanjan D. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *Eur. J. Exp. Biol.*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 163–173.
4. Pandey A., Ali I., Butola K.S., Chatterji T., Singh V. Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, 2011, vol. 2, no. 4, pp. 384–392.
5. Waksman S.A., Lechevalier H. The actinomycetes. V. III. Baltimore, USA, Williams and Wilkins Co., 1962, 438 p.
6. Zenova G.M. Soil Actinomycetes of Rare Genera. Moscow, Izd. Mosk. Univ., 2000, 81 p. (In Russian)
7. Gauze G.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A., Terekhova L.P., Maksimova T.S. Indicators of Actinomycetes. Moscow, Nauka, 1983, 245 p. (In Russian)

8. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, no. 3, pp. 426–428.
9. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, beta-glucanase, and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, no. 1, pp. 80–87.
10. Khaziev F.Kh. The Methods of Soil Enzymology. Moscow, Nauka, 2005, 252 p. (In Russian)
11. Akberova N.I. Descriptive Statistics. Interval Estimations. Kazan, Kazan. Gos. Univ., 2005, 51 p. (In Russian)
12. Genilloud O., González I., Salazar O., Martín J., Tormo J.R., Vicente F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 38, no. 3, pp. 375–389.
13. Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L., Beaulieu C. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 2002, vol. 82, no. 3, pp. 85–102.
14. Narayana K.J.P., Vijayalakshmi M. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Braz. J. Microbiol.*, 2009, vol. 40, no. 10, pp. 725–733.
15. Neurath H. The diversity of proteolytic enzymes. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford, Oxford Univ. Press, 1989, pp. 1–13.

Received
June 29, 2012

Bolormaa Chuluun – PhD Student, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: chboloroo0809@yahoo.com

Abdul Ahmad Nuri – Student, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: abdulahmadnoori@yandex.ru

Kadyrova Guzel Damirovna – PhD in Biology, Research Fellow, Scientific Research Laboratory for the Biochemistry of Nucleic Acids, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: gjuzelka@gmail.com

Pankova Anna Viktorovna – PhD Student, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: pankova.anya@gmail.com

Evtyugin Vladimir Gennadevich – PhD in Biology, Assistant Lecturer, Department of Invertebrate Zoology and Functional Histology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: vevtugyn@gmail.com

Alimova Farida Kashifovna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com