

**ФИТОТОКСИЧНОСТЬ, ФУНГИЦИДНАЯ И БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ
STREPTOMYCES ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ****Сапармырадов К.А.¹, Миндубаев А.З.²**¹ ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18;² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и
физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 420088, г. Казань, ул. Арбузова 8.

e-mail: mindubaev@iopc.ru

поступила в редакцию 09 декабря 2014 года

Аннотация

Пять штаммов стрептомицетов сравнивались на предмет антагонистического подавления тест-организмов различной таксономической принадлежности – бактерий, низших грибов (дрожжей), одноклеточных зеленых водорослей и двух сорных травянистых растений. Стрептомицеты были выделены из различных местообитаний (клубни картофеля, образцы почвы из различных районов земного шара, а также осадков сточных вод, отравленных белым фосфором), что определило различия в их антибиотической активности. В частности, штамм *Streptomyces* species A8, выделенный из токсичного осадка, в отличие от остальных, совершенно не подавлял рост высших растений.

Ключевые слова: *Streptomyces*, антибиотическая активность, фитотоксичность.

Введение. Одна из форм антагонистических отношений – антибиоз – в основе своей имеет способность одного вида организма выделять токсические вещества, угнетающие жизнедеятельность других. Именно на этом свойстве основано получение различных антибиотиков из грибов, актиномицетов, бактерий и других организмов, продуцирующих в окружающую среду антагонистически действующие вещества. Как известно, актиномицеты рода *Streptomyces* экскретируют во внешнюю среду множество продуктов своего метаболизма, в том числе и антибиотики [1]. Они могут обладать бактериостатическим или бактериолитическим, а также фунгицидным и гербицидным [2] действием. Но стрептомицеты известны не только как «живые фабрики» антибиотиков. Вызывает интерес их широчайшая распространенность и приспособленность к самым разнообразным местообитаниям [3].

Целью настоящего исследования стало сравнение антибиотической и фитотоксической активности пяти штаммов стрептомицетов, выделенных из различных источников, таких как клубни картофеля, почвенный покров из Республики Татарстан и Монголии. Один штамм выделен из совсем экзотического источника – осадков сточных вод с добавлением токсичного ксенобиотика белого фосфора: последний штамм является одним из первых известных живых организмов, выработавших устойчивость к белому фосфору [4-11], и, возможно, принимает участие в его биодеградации.

Материалы и методы исследования. В работе использовались изоляты *Streptomyces*: *S.sp.1*, *S. sp.2*, выделенные из клубней картофеля, *S. sp.77* из почвы Восточно-Гобийского аймака (Монголия), *S. sp.532* и *S. sp.547* из чернозема Черемшанского района Республики Татарстан, *S. sp.749* из дерново-подзолистой почвы г.Елабуги (Республика Татарстан), *S. sp.A8* из осадка водоочистных сооружений г.Казани, в который была добавлена эмульсия белого фосфора в концентрации 0.01%, и в котором микрофлора оставалась угнетенной длительное время (о последнем субстрате и выделенных из него стрептомицетах подробнее сказано в работах [4,8,9]).

Для определения антибиотической активности в качестве тест-организмов использованы бактерии *Bacillus megaterium* и *Pseudomonas putida*, пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Для определения фитотоксичности использовались семена сорных растений

щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*) и лебеда голостебельная (*Atriplex nudicaulis*), а также одноклеточная зеленая водоросль (*Chlorella vulgaris*).

Использованные среды

Среда Гаузе 1 (г/л) [12]: (состав, г/л: крахмал (растворимый) – 20; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KNO_3 – 1,0; NaCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; агар-агар – 20; pH – 7,2-7,4).

Среда Гаузе 2 (г/л) [12] (состав, г/л: бульон Хоттингера – 30; пептон – 5,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 5,0; pH – 7,0-7,2).

Среда Лурия-Бертани (LB) (г/л): триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г, вода – 1 л.

Среда Тамия (г/л) [13] (состав, г/л: KNO_3 – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,25; ЭДТА – 0,037; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,009; раствор микроэлементов Тамия* – 1мл; агар-агар – 20)

*раствор микроэлементов Тамия (г/л) (состав, г/л: H_3BO_3 – 2,86; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 1,81; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,222; MoO_3 – 0,018; NH_4VO_3 – 0,023)

Исследуемые биологически активные вещества актиномицетов, содержащиеся в культуральной жидкости, включают в себя и антибиотики. В связи с этим, культуральная жидкость (КЖ) была проверена на антибиотическую активность по отношению к *Bacillus megaterium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida*.

Фитотоксичность определяли и оценивали по методу Алимовой [14] по действию КЖ *Streptomyces* на семена сорных растений – щирица и лебеда. Актиномицеты выращивали на среде Гаузе-2 в течение 3-7 суток в колбах объемом 200 мл с постоянным перемешиванием 100-150 об/мин. Отбирали по 150 семян и замачивали в культуральной жидкости (КЖ) или почвенной вытяжке в двух разведениях: 1:100, 1:10. Через 24 часа семена раскладывали на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Контролем служили семена, замоченные в водопроводной воде и стерильной питательной среде. Через 24 часа подсчитывали всхожесть семян, на 3 сутки подсчитывали энергию прорастания и измеряли длину проростков и корней семян. На 7 сутки измеряли длину проростков и корней семян и определяли сухую и сырую массу проростков и корней, производили подсчет фитотоксической активности по формуле:

$$A_f = 100 - \left(\left(\frac{D_x - D_n}{D_k - D_n} \right) * 100 \right),$$

где A_f – фитотоксическая активность в % ингибирования роста корней;

D_x – средняя длина корней (проростков) на 7 сутки в опытном варианте (см);

D_k – средняя длина корней (проростков) на 7 сутки в контроле (см);

D_n – начальная длина корней (проростков) (см).

Фитотоксичность КЖ актиномицетов оценивали по длине, сырой и сухой массе корней и проростков сорняков лебеда и щирицы. Семена обрабатывали 3-х и 7-ми суточной КЖ актиномицетов, стерильной средой Гаузе как источника питательных веществ. В качестве контроля использовались вода и стерильная минеральная среда Гаузе 2.

Наличие в культуральной жидкости фитотоксинов определяли по ростовым эффектам (по количеству проросших семян и длине проростков и корней). Токсичными считают культуры, вызывающие снижение всхожести семян или угнетения роста проростков и корней не менее чем на 30% по сравнению с контролем.

Так же определяли фитотоксичность по действию КЖ *Streptomyces* на одноклеточную зеленую водоросль *C. vulgaris*, культура которой была любезно предоставлена из музея института экологии КФУ.

Актиномицеты выращивали в чашке Петри на среде Гаузе1. Хлореллу выращивали на среде Тамия, затем добавляли к актиномицетам и чашки выставляли в светотеплицу с температурой 26°C. Через 3-5 суток инкубирования в светотеплице микроорганизмы – продуценты фитотоксических веществ образуют ясно выраженные зоны отсутствия роста хлореллы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel. Использовали дисперсионный анализ. Для сравнения нескольких групп между собой

применяли критерий Стьюдента. Кроме того, были проведены регрессионный и корреляционный анализы.

Результаты исследования и их обсуждение. Была исследована антибиотическая активность актиномицетов на бактерии *B. megaterium* и *P. putida*, и дрожжи *S. cerevisiae*. В результате были выявлены штаммы актиномицетов, подавляющие их рост (таблица 1).

Таблица 1. Антибиотическая активность актиномицетов

Тест-культуры	<i>S. sp.749</i>	<i>S. sp. A8</i>	<i>M. sp. 77</i>	<i>S. sp. 1</i>	<i>S. sp.2</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	-	-

Примечание: зона ингибирования : + есть активность, - нет активности

По полученным нами данным, выделенные из разных субстратов штаммы актиномицетов подавляют рост *B. megaterium*.

Нами исследовалось влияние культуральной жидкости актиномицетов различных изолятов рода *Streptomyces*, выделенных на территории РТ и Монголии на угнетение корней и проростков сорных растений – щирицы и лебеды, и одноклеточной водоросли хлореллы.

В результате проведенного нами опыта выяснили, что подавляющим действием на водоросль обладают штаммы актиномицетов, представленные в таблице 2.

Таблица 2. Фитотоксичность изолятов культуральной жидкости актиномицетов по отношению к *C. vulgaris*

Наименование изолята	Результаты
<i>S. sp.77</i>	+++
<i>S. sp.A 8</i>	+++
<i>S. sp.532</i>	+++
<i>S. sp. 1</i>	++
<i>S. sp. 547</i>	+
<i>S. sp. 2</i>	+

Примечание: ингибирование +++ сильное, ++ среднее, + слабое

Для разведения КЖ в 1:10 и 1:100 показано достоверное ингибирующее влияние на щирицу и лебеду (таблица 3).

Проводились испытания на энергию прорастания семян *A. nudicaulis* и *A. retroflexus*, обработанных КЖ актиномицетов, полученной на минеральной среде Гаузе 2 с разведением 1:100, 1:10. Наилучшая всхожесть наблюдалась у семян щирицы запрокинутой с КЖ (разведение 1:10) *S. sp.*, *S. sp. A8* и *S. sp. 2*, и у семян лебеды голостебельной с КЖ (разведение 1:10) *S. sp. A8*. Таким образом, штамм, выделенный из ОСВ с белым фосфором, единственный, не оказывающий фитотоксическое действие на высшие растения [11].

Таблица 3. Влияние культуральной жидкости *Streptomyces* на всхожесть и рост проростков семян *Atriplex nudicaulis* и *Amaranthus retroflexus*

Наименование изолята	<i>A. nudicaulis</i> , всхожесть, %				<i>A. retroflexus</i> , всхожесть, %			
	разведение культуральной жидкости							
	на 3 сутки КЖ		на 7 сутки КЖ		на 3 сутки КЖ		на 7 сутки КЖ	
	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
<i>S. sp. 1</i>	10	0	20	0	10	40	15	50
<i>S. sp. 2</i>	0	5	0	5	80	75	90	85
<i>S. sp. A8</i>	55	25	70	40	75	90	100	95
<i>S. sp. 749</i>	10		10	-	0	-	0	-
<i>S. sp. M77</i>	10	0	20	0	15	30	20	40
Стерильная среда	45		70		75		85	

Было рассмотрено влияние комплекса метаболитов штаммов на развитие тест-растений. Наибольшее ингибирующее действие на длину корней лебеды голостебельной оказал штамм *S. sp.* 749 (разведение 1:100). Так же ингибирующим действием обладали следующие штаммы: *S. sp.* M. 77, *S. sp.* 1 (1:10), *S. sp.* 2 (1:100, 3 день) (рисунок 1, вверху).

Наибольшее ингибирующее действие на длину проростков лебеды голостебельной оказал штамм *S. sp.* 749 (1:100), хорошим ингибирующим действием обладали также штаммы *S. sp.* 77, *S. sp.* 1 (3 сутки) (рисунок 1).

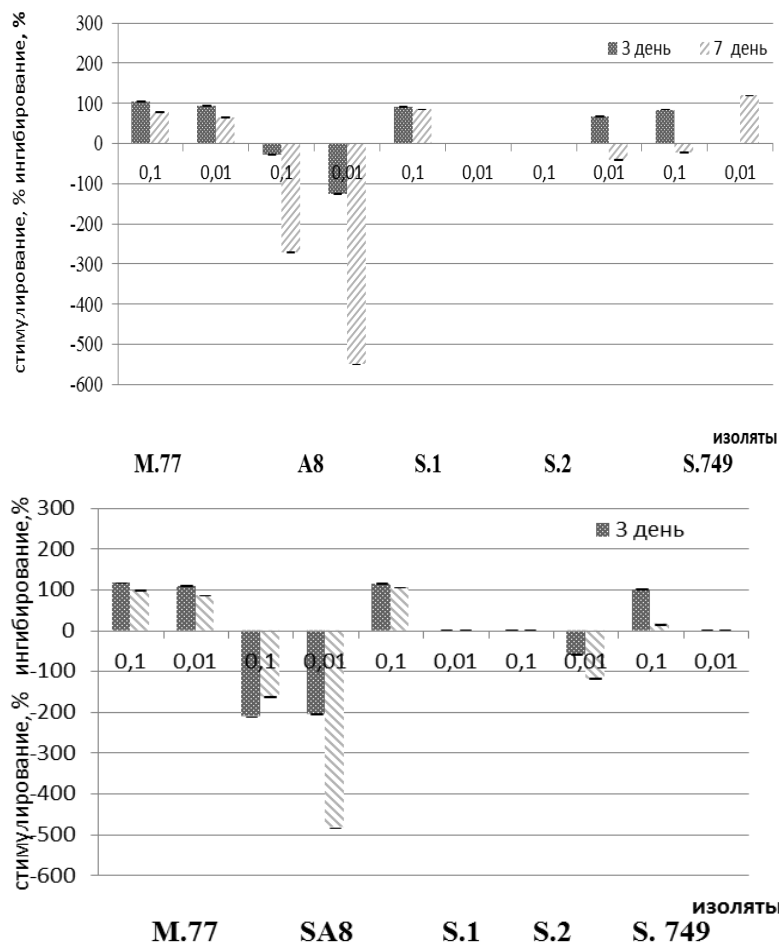


Рисунок 1. – Фитотоксическое воздействие *Streptomyces* на длину корней (вверху) и проростков (внизу) *A. nudicaulis* на 3 и 7 сутки.

Рассмотрим воздействие штаммов на рост проростков лебеды. Наиболее стимулирующим действием обладал штамм *S. sp.* A8 (разведение 1:100), а ингибирующим действием – штамм *S. sp.* 749 (разведение 1:100) [11].

Далее, рассмотрим воздействие актиномицетов на рост корней (вверху) и проростков (внизу) щиряцы запрокинутой. Из рисунка видно, что наиболее выраженным ингибирующим действием обладал штамм *S. sp.* 749 (разведение 1:10) (рисунок 2).

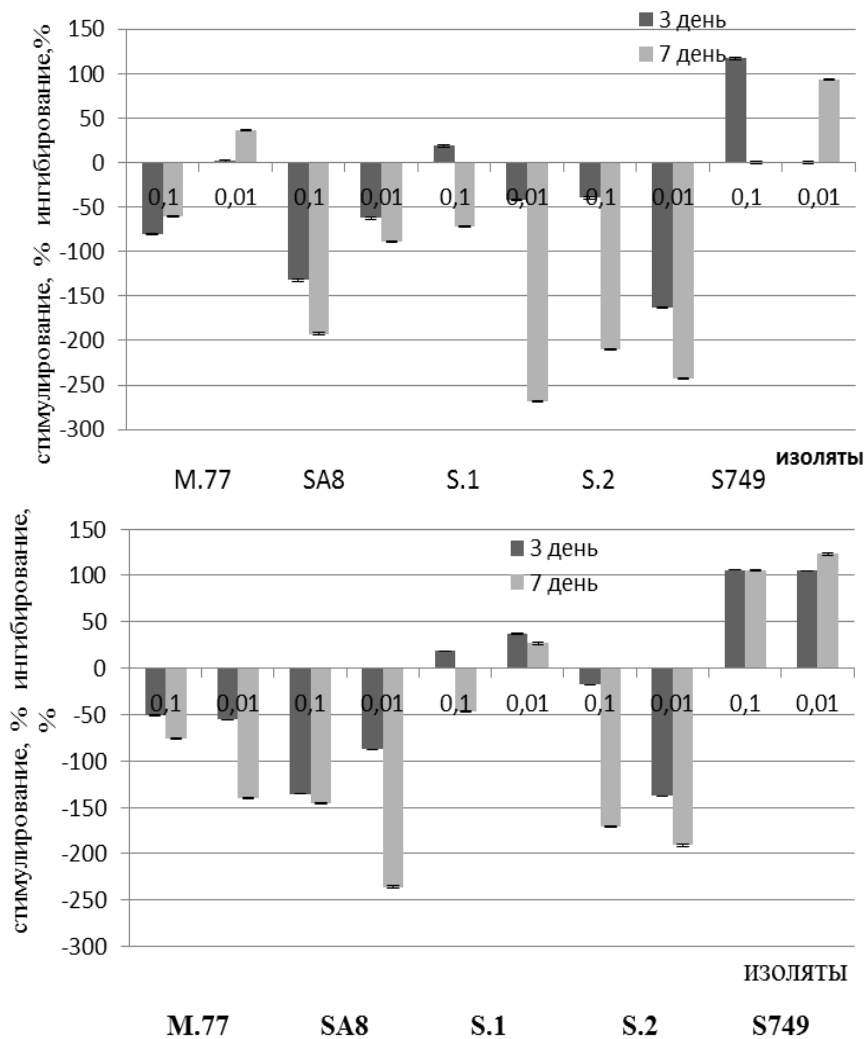


Рисунок 2. – Фитотоксическое воздействие *Streptomyces* на длину корней (вверху) и проростков (внизу) *A. retroflexus* на 3 и 7 сутки.

Вес растений замерялся на 7-е сутки после обработки КЖ. В контрольном варианте сырая масса корней сорняка составила 0.36 г, при обработке стерильной средой Гаузе – 0.39 г. Сырая масса проростков составила 0,4 г, при обработке стерильной средой Гаузе – 0.41 г.

Угнетение роста и развития тест-растения связано с наличием среди метаболитов исследованных актиномицетов фитотоксинов. Некоторые токсины вызывают внешне слабо выраженное угнетение роста растений, которое, однако, отражается на биохимических процессах, протекающих в тканях. В таких растениях нарушается химический состав. При большом скоплении токсинов происходит отравление почвы (утомление). На таких почвах развитие растений угнетается, продуктивность снижается, поэтому фитотоксичность стрептомицетов представляет не только научный, но и практический интерес.

Итак, наибольшим ингибирующим действием на рост корней и проростков сорняков *Atriplex nudicaulis* и *Amaranthus retroflexus* обладал штамм *Streptomyces* sp. 749. Подавляющим действием на водоросль *Chlorella vulgaris* обладали штаммы *S.* sp. 532 и *S.* sp. 77. Наибольшую антибиотическую активность по отношению к сенной палочке *Bacillus megaterium* и пекарским дрожжам *Saccharomyces cerevisiae* проявил штамм *S.* sp. 749, а по отношению к *Pseudomonas putida* – штамм *S.* sp. M 77, под действием которого рост сократился в 4.5 раз по сравнению с контролем. Вызывает интерес тот факт, что штамм *S.* sp. A8 совершенно не проявлял фитотоксическое влияние на оба сорняка [11]. Вероятно, это связано с тем, что в среде обитания этого штамма (осадки сточных вод) отсутствуют высшие растения. По этой же причине большинство штаммов стрептомицетов, в том числе *S.* sp. A8, не подавляли рост пекарских дрожжей. Возможно, и присутствие ядовитого вещества повлияло на свойства культуры, у которой пропала необходимость синтезировать

собственные токсины. Зато данный штамм эффективно подавляет зеленые водоросли и бациллы – организмы, близкие к обитающим в сточных водах. В работе [10] сообщается, что представители рода *Bacillus* также вырабатывают адаптации к присутствию белого фосфора, следовательно, бациллы и *S. sp. A8* могут конкурировать даже в условиях сильнейшего химического загрязнения, что не может не вызывать удивление. Этим и объясняется угнетающее влияние *S. sp. A8* на *B. megaterium*.

Таким образом, штамм *S. sp. A8* отличается от четырех других штаммов стрептомицетов отсутствием фитотоксичности по отношению к высшим растениям. По всей видимости, это вызвано особенностью местообитания данного штамма.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-08-31091 мол_а. Авторы выражают искреннюю признательность Чулуун Болормаа, Фариде Кашифовне Алимовой и Дмитрию Григорьевичу Яхварову за неоценимую помощь в работе.

Список литературы

- 1) Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учеб. для студентов биолог. спец. ун-тов. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, Наука. 2004. 528 с.
- 2) Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С. Актиномицеты и растения // Успехи микробиологии. 1990. Т.25. С.26-65.
- 3) Waksman S.A. The Actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species. Baltimore: The Williams and Wilkins Company. 1961. V.2. P.61-292.
- 4) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Белый фосфор как новый объект биодegradации // Грани науки. 2013. Т.1,№1. С.65-68.
- 5) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Зависимость скорости деструкции белого фосфора в осадке сточных вод от интенсивности микробного метаболизма // Грани науки. 2013. Т.1,№2. С.58-62.
- 6) Ахоссийенагбе С.К., Миндубаев А.З. Поиск метаболитов белого фосфора // Грани науки. 2014. Т.2,№1. С.82-87.
- 7) Горбачук Е.В., Миндубаев А.З. Исследование субстратов с концентрацией белого фосфора 0.1% на предмет метаболитов и устойчивой микрофлоры // Грани науки. 2014. Т.2,№2. С.33-39.
- 8) Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Возможность анаэробной детоксикации белого фосфора // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.33,№1. С.22-34.
- 9) Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Болормаа Ч. Возможность анаэробной биодegradации белого фосфора // Экологический вестник Северного Кавказа. 2013. Т.9,№2. С.4-15.
- 10) Миндубаев А.З., Алимова Ф.К., Ахоссийенагбе С.К., Волошина А.Д., Горбачук Е.В., Кулик Н.В., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. Метаболиты и устойчивая микрофлора в субстратах с содержанием белого фосфора 0.1% // Бутлеровские сообщения. 2014. Т.37,№3. С.67-78.
- 11) Болормаа Ч., Сапармырадов К.А., Алимова Ф.К., Миндубаев А.З. Сравнение показателей фитотоксичности, фунгицидной и бактерицидной активности стрептомицетов из различных местообитаний // Бутлеровские сообщения. 2014. Т.38,№6. С.147-152.
- 12) Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 258 с.
- 13) Кузнецов Е.Д., Владимиров М.Г. Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия // Физиология растений. 1964. Т.11, Вып.4. С.615-619.
- 14) Алимова Ф.К., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Методические указания к выполнению лабораторных работ по теме: экология микроорганизмов. Казань: КГУ. 1993. 37 с.