

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 4, Number 316 (2016), 86 – 91

TAXONOMIC INVESTIGATED STRAINS OF ACTINOMYCETES K-37, STIMULATE GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTS

L. Trenochnikova, S. Daugalieva, G. Ultanbekova,
R. Galimbaeva, A. Balgymbayeva, A. Masirbaeva

RSOE “Institute of Microbiology and Virology” CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: barahitian@yandex.ru

Keywords: streptomycete, antifungal activity, growth-stimulating activity, cereal crops, salt stress.

Abstract. The article presents data on the study of genotypic and phenotypic characteristics of the strain K-37, which stimulates plant growth and development. Phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences revealed that the K-37 strain was a member of the family Streptomycetaceae, genus *Streptomyces*. By spore type, K-37 is related to the RF-type, the number of spores in chains exceeds 10. Spores are oval in shape and have smooth surface. The strain K-37 absorbs well the majority of the researched sources of carbon and has a tyrosinase, amylolytic and gelatinase activity. Based on the study of cultural-morphological and physiological-biochemical properties, the strain K-37 was identified as *Streptomyces candidus*.

УДК 631.46:579.64

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ШТАММА АКТИНОМИЦЕТА K-37, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Л. П. Треножникова, С. Т. Даугалиева, Г. Д. Ултанбекова,
Р. Ш. Галимбаева, А. С. Балгимбаева, А. Д. Масирбаева

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: стрептомицет, антифунгальная активность, ростстимулирующее действие, зерновые культуры, солевой стресс.

Аннотация. Приводятся данные по изучению генотипических и фенотипических признаков штамма K-37, стимулирующего рост и развитие растений. Филогенетический анализ последовательностей 16S rRNA гена показал, что штамм K-37 является представителем семейства Streptomycetaceae, рода *Streptomyces*. По типу спороношения штамм K-37 относится к RF-типу, количество спор в цепочках более 10. Споры имеют овальную форму и гладкую поверхность. Штамм K-37 хорошо усваивает большинство исследованных источников углерода и обладает тирозиназной, амилолитической и желатиназной активностью. На основании изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штамм K-37 идентифицирован как *Streptomyces candidus*.

Виды рода *Streptomyces* являются представителями класса *Actinobacteria*, важной группы многочисленных и универсальных почвенных микроорганизмов, учитывая их способность синтезировать метаболиты различного спектра действия, участие в процессах биотрансформации веществ, способность разлагать лигноцеллюлозу, хитин, ксилан, лигнин, и фундаментальную роль в биологических циклах органической материи [1, 2]. Помимо почвы стрептомицеты широко распространены в пресноводной и морской среде обитания. Другой примечательной особенностью рода *Streptomyces* является большое количество описанных видов, которые он содержит, к настоящему времени их известно более 600 [3]. Видовая классификация рода уточняется путем

использования в комплексе как генотипических, так и фенотипических процедур [4-9]. Недавний прогресс в методах секвенирования генома привел к открытию, что представители рода *Streptomyces* имеют огромный потенциал для синтеза вторичных метаболитов с разнообразными свойствами [10, 11]. До появления молекулярных подходов для систематики стрептомицетов использовались простые диагностические ключи, такие как морфологические и фенотипические характеристики. Однако, использование только простых идентификационных ключей не может обеспечить адекватную идентификацию по сравнению с полифазной систематикой. По предложению Kämpfer и др. [4] описание видов рода *Streptomyces* должно быть основано на комбинации генотипических и фенотипических данных.

Целью работы являлось изучение генотипических и фенотипических признаков штамма К-37, стимулирующего рост и развитие растений, и его видовой идентификация.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований являлся штамм актиномицета К-37, выделенный из солончаковых почв Северного Казахстана.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию полученной ДНК измеряли на флуориметре Quibit 2.0. Генетические библиотеки ДНК для секвенирования на MiSeq готовили по протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation [12] с использованием праймеров к V3 и V4 регионам 16S *rRNA* гена, а также олигонуклеотидных адаптеров Illumina. Анализ последовательности ДНК проводили на приборе MiSeq согласно руководства к прибору «MiSeq® System User Guide». Биоинформатический анализ данных, полученных в результате секвенирования проводили с использованием программы MiSeq Reporter.

Таксономическое изучение штамма К-37 на основе фенотипических признаков проводили по методике, рекомендованной Shirling и Gottlieb [13-16]. Тип цепочек спор определяли у зрелой культуры на 10 сутки роста. Изучение морфологических признаков штамма проводили с помощью тринокулярного микроскопа Leica DMLS с цифровой видеокамерой Leica DC 300F. Поверхность спор изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jem-100В без фиксации. Наблюдение и фотосъемку проводили при 80 кВ с увеличением 10–30 тысяч, без контрастирования материала. Исследования проводили в 10 повторностях.

Изучение культуральных признаков: цвета воздушного, субстратного мицелия и растворимых пигментов – проводили на 7, 14, 21 сутки роста культуры на диагностических средах ISP, рекомендованных Shirling и Gottlieb, а также средах, рекомендованных Гаузе и др. [17]. На диагностических средах отмечали цвет, характер и степень развития воздушного мицелия, окраску субстратного мицелия, наличие и окраску растворимых пигментов. Для объективной оценки окраски использовали шкалу цветов Бондарцева [18].

Изучение усвоения углеводов штаммом К-37 проводили на среде Придгейма и Готтлиба по методике, рекомендованной Shirling и Gottlieb [13]. В качестве источников углерода использовали широкий набор веществ: моносахариды, олигосахариды, полисахариды, спирты. Физиолого-биохимические признаки штамма К-37 исследовали с использованием общепринятых методик [13].

Результаты исследований и их обсуждение

После обработки программой MiSeq Reporter данных, полученных при секвенировании, было установлено таксономическое происхождение штамма К-37 (рисунок 1).

Как видно из рисунка 1, филогенетический анализ последовательностей участков гена 16S *rRNA* в сравнении с данными Международной базы данных Greengenes, показал, что штамм является представителем семейства *Streptomycetaceae*, рода *Streptomyces*.

При культивировании штамма *Streptomyces* spp. К-37 на минеральном агаре 1 Гаузе через 10 дней роста в колониях наблюдаются гифы различного диаметра – от 0,2 до 0,5 мкм. Для штамма характерны длинные, прямые, ветвящиеся гифы воздушного мицелия. Во внутренних частях колоний образуются длинные прямые или изогнутые гифы субстратного мицелия с многочисленными веточками. Споры формируются на воздушном мицелии стрептомицетов. Количество спор в

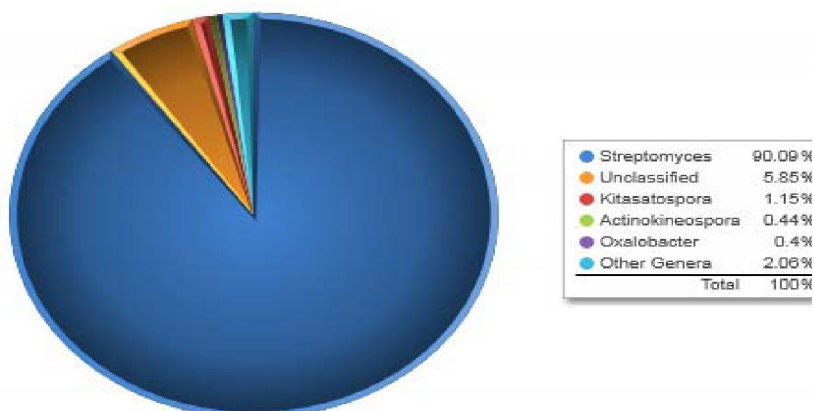


Рисунок 1 – Результаты молекулярно-генетической идентификации штамма К-37 в программе MiSeq Reporter

цепочках более 10. По типу спороношения штамм *Streptomyces* spp. К-37 относится к RF-типу и имеет цепочки спор прямые или извитые. Изучение формы и характера поверхности спор является одной из важных морфологических характеристик для определения таксономического положения штаммов стрептомицетов. Штамм К-37 образует цепочки спор овальной формы, споры имеют гладкую поверхность (рисунок 2).

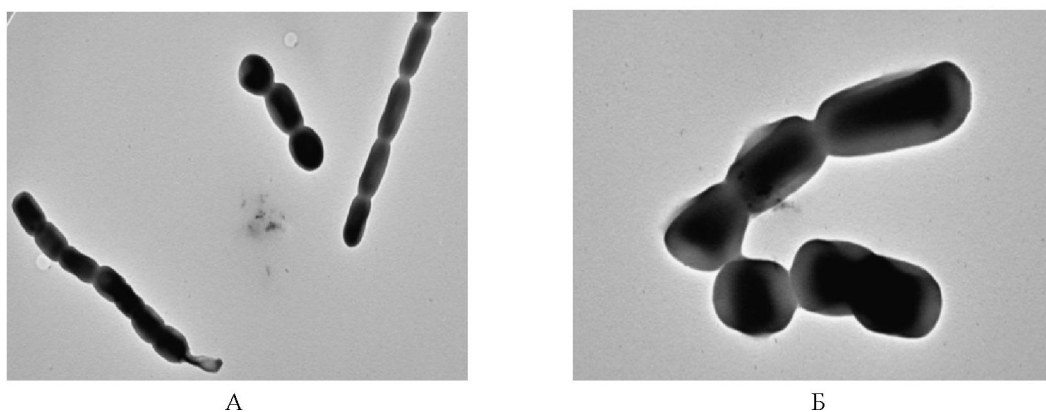


Рисунок 2 – Форма и поверхность спор штамма *Streptomyces* spp. К-37 (увеличение: А – х 15 000, Б – х 30 000)

Штамм *Streptomyces* spp. К-37 обильно растет на минеральном агаре 1 Гаузе, сахарозо-дрожжевом агаре Чапека, овсяном агаре, хорошо растет на органических агарах 2 Гаузе и Праузера 79, сахарозо-нитратном агаре Чапека. Рост штамма отсутствует на глюкозо-аспарагиновом и картофельно-декстрозном агаре (таблица 1). Цвет воздушного мицелия штамма К-37 на диагностических средах изменяется от белого до светло-кремового и серого, цвет субстратного мицелия от бесцветного до светло-желтоватого и бурого. У штамма К-37 на исследованных диагностических средах не наблюдается пигментообразование. На пептонно-дрожжевом агаре с железом меланоидный пигмент не образуется.

Данные по изучению физиолого-биохимических признаков штамма К-37 представлены в таблицах 2, 3.

Штамм *Streptomyces* spp. К-37 хорошо усваивает большинство изученных источников углерода. Установлено, что штамм К-37 в большей степени усваивает глюкозу, ксилозу, арабинозу, рамнозу, маннит, мальтозу, сорбит, рамнозу, инозит, раффинозу, лактозу, галактозу, дульцит; слабо усваивает сахарозу, фруктозу, раффинозу, целлюлозу; очень слабо усваивает Твин 80, лимоннокислый натрий и инозит; не усваивает ацетат натрия и целлюлозу.

Установлено, что штамм *Streptomyces* spp. К-37 обладает тирозиназной, амилолитической и желатиназной активностью. На четвертые сутки разжижает верхний слой столбика желатины. Слабо пептонизирует молоко. Не проявляет лецитиназной и целлюлолитической активности. Не обладает денитрифицирующей способностью и не восстанавливает нитраты до нитритов.

Таблица 1 – Культуральные признаки штамма *Streptomyces* spp. К-37 на диагностических средах

Среда	Рост	Цвет воздушного мицелия	Цвет субстратного мицелия	Образование пигментов
Минеральный агар 1 Гаузе	Обильный	Белый до светло-кремового	Бесцветный до светло-желтоватого	Не образует
Органический агар 2 Гаузе	Хороший	Белый	Бесцветный	Не образует
Глюкозо-нитратный агар	Умеренный	Белый	Бесцветный	Не образует
Сахарозо-нитратный агар Чапека	Хороший	Светло-серый	Светло-бурый	Не образует
Глицерин-нитратный агар	Умеренный	Белый	Бесцветный	Не образует
Сахарозо-дрожжевой агар Чапека	Обильный	Светло-кремовый	Бурый	Не образует
Крахмально-аммиачный агар (ISP 4)	Умеренный	Отсутствует	Серо-бурый	Не образует
Овсяной агар (ISP 3)	Обильный	Белый до кремового	Бесцветный	Не образует
Пептонно-дрожжевой агар с железом (ISP 6)	Хороший	Серый	Бурый	Не образует меланоидный пигмент

Таблица 2 – Утилизация источников углерода штаммом *Streptomyces* spp. К-37

Источники углерода	Уровень утилизации
Мальтоза	++
D-маннит	++
D-сорбит	++
L-арабиноза	++
Рамноза	++
I-инозит	++
I-дульцит	++
Раффиноза	+
D-фруктоза	+
D-галактоза	+++
Лактоза	++
Сахароза	+
D-глюкоза	++
Крахмал	++
Целлолоза	+
D-ксилоза	++
Контроль	++
Инозит	+–
Твин 80	+–
Натрий лимоннокислый	+–
Натрий уксуснокислый	–

Примечание. Ярко-выраженная положительная утилизация – (+++); положительная утилизация – (++); сомнительная утилизация – (+); отрицательная утилизация – (–).

Таблица 3 – Физиолого-биохимические признаки штамма *Streptomyces* spp. К-37

Изученные свойства	Уровень активности
Расщепление тирозина	+
Гидролиз крахмала	+
Разжижение желатины	+
Коагуляция молока	–
Пептонизация молока	+
Разложение целлолозы	+
Расщепление лецитина	–
Редукция нитратов	–
Денитрифицирующая способность	–

Примечание. Умеренная активность – (+), отсутствие активности – (–).

На основании изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штамм *Streptomyces* spp. К-37 был идентифицирован как *Streptomyces candidus* (ex Krasilnikov 1941, Svshnikova 1983) [17, 19].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of Actinomycetes // Annual Review of Microbiology. – 1983. – Vol. 37. – P. 189-216.
- [2] Chaudhary H.S., Soni B., Shrivastava A.R., Shrivastava S. Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2013. – Vol. 3, suppl. 1. – P. 83-94.
- [3] Euzéby J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – Vol. 47, N 2. – P. 590-592.
- [4] Kampf P., Huber B., Buczolits S., Thummes K., Grun-Wollny I., Busse H.-J. *Streptomyces specialis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P. 2602-2606.
- [5] Kumar Y., Goodfellow M. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 769-775.
- [6] Rong X., Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 696-703.
- [7] Hohmann C., Schneider K., Bruntner C., Brown R., Jones A.L., Goodfellow M., Kramer M., Imhoff J.F., Nicholson G. et al. Albidopyrone, a new a-pyrone-containing metabolite from marine-derived *Streptomyces* sp. NTK 227 // J. Antibiot. – 2009. – Vol. 62. – P. 75-79.
- [8] Busti E., Monciardini P., Cavaletti L., Bamonte R., Lazzarini A., Sosio M., Donadio S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes // Microbiology. – 2006. – Vol. 152. – P. 675-683.
- [9] Lam K.S. New aspects of natural products in drug discovery // Trends Microbiol. – 2007. – Vol. 15. – P. 279-289.
- [10] Ikeda H. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* // Nat. Biotechnol. – 2003. – Vol. 21. – P. 526-531.
- [11] Ohnishi Y. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing a microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190. – P. 4050-4060.
- [12] 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation // Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. www.illumina.com
- [13] Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1966. – Vol. 16. – P. 313-340.
- [14] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative Description of Type Cultures of *Streptomyces*. III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1968. – Vol. 18. – P. 279-392.
- [15] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1969. – Vol. 19. – P. 391-512.
- [16] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1972. – Vol. 22. – P. 265-394.
- [17] Гаузе Н.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. – М.: Наука, 1983. – 245 с.
- [18] Бондарцев А.С. Шкала цветов. – М.: АН СССР. – 1954. – 31 с.
- [19] Валугурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутская Г.А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации. – Киев: Наукова Думка, 2003. – 645 с.

REFERENCES

- [1] Goodfellow M., Williams S.T. Ecology of Actinomycetes // Annual Review of Microbiology. 1983. Vol. 37. P. 189-216.
- [2] Chaudhary H.S., Soni B., Shrivastava A.R., Shrivastava S. Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production // Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013. Vol. 3, suppl. 1. P. 83-94.
- [3] Euzéby J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. Vol.47, N 2. P. 590-592.
- [4] Kampf P., Huber B., Buczolits S., Thummes K., Grun-Wollny I., Busse H.-J. *Streptomyces specialis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. Vol. 58. P. 2602-2606.
- [5] Kumar Y., Goodfellow M. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 769-775.
- [6] Rong X., Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 696-703.

- [7] Hohmann C., Schneider K., Bruntner C., Brown R., Jones A.L., Goodfellow M., Kramer M., Imhoff J.F., Nicholson G. et al. Albidopyrone, a new a-pyrone-containing metabolite from marine-derived *Streptomyces* sp. NTK 227 // *J. Antibiot.* 2009. Vol. 62. P. 75-79.
- [8] Busti E., Monciardini P., Cavaletti L., Bamonte R., Lazzarini A., Sosio M., Donadio S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes // *Microbiology.* 2006. Vol. 152. P. 675-683.
- [9] Lam K.S. New aspects of natural products in drug discovery // *Trends Microbiol.* 2007. Vol. 15. P. 279-289.
- [10] Ikeda H. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 526-531.
- [11] Ohnishi Y. et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190. P. 4050-4060.
- [12] 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation // Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. www.illumina.com
- [13] Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1966. Vol. 16. P. 313-340.
- [14] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative Description of Type Cultures of *Streptomyces*. III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1968. Vol. 18. P. 279-392.
- [15] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1969. Vol. 19. P. 391-512.
- [16] Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1972. Vol. 22. P. 265-394.
- [17] NF Gause, Transfiguration TP, Sveshnikov, MA, LP Terekhova, Maksimova TS The determinant of actinomycetes. M.: Science, 1983. 245 p.
- [18] AS Bondartsev Shkala colors. M.: USSR, 1954. 31 p.
- [19] Valugurova EV Kozyrskaya VE Iutskaya GA Actinomycetes genus *Streptomyces*. Identify the types of computer software and their identification. Kiev: Naukova Dumka, 2003. 645 p.

ӨСІМДІКТІҢ ДАМУЫН ЖӘНЕ ӨСУІН ТЕЗДЕТЕТІН К-37 АКТИНОМИЦЕТ ШТАММЫНЫҢ ТАКСОНОМИКАЛЫҚ ЗЕРТТЕУІ

Л. П. Треножникова, Г. Д. Улганбекова, С. Т. Даугалаева,
Р. Ш. Галимбаева, А. С. Балгимбаева, А. Д. Масирбаева

Микробиология және вирусология институты ҚР БҒМ ҒМ, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: стрептомицет, антифунгалды белсенділік, өсуді тездететін әсер, астық дақылдары, тұзды стресс.

Аннотация. Мақалада өсімдіктің дамуын және өсуін тездететін К-37 штаммының генотиптік және фенотиптік белгілері зерттелген. Филогенетикалық талдау тізбектерінде 16S rRNA гені, К-37 штаммы *Streptomyces* тұқымдасының, *Streptomyces* туысына жататындығы көрсетілді. Спора түзу типі бойынша К-37 штаммын RF-типінә жатқызуға болады, тізбекте споралардың саны 10-нан аса екендігі көрсетілген. Споралары сопақша келген және беті тегіс. К-37 штаммы зерттелген көптеген көміртек көздерін жақсы сіңіретіндігі және тирозиназды, амилolitikалық и желатиназды белсенділігі бар екендігі анықталды. Дақылдық-морфологиялық және физиолого-биохимиялық белгілері бойынша К-37 штамы *Streptomyces candidus* түріне жататындығы анықталды.

Поступила 04.05.2016 г.