

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПОЧВ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА

А.П.Науанова^{1,2}, Д.М. Ернашева²,
Г.С. Шахабаева², А.Е. Ермеков^{1,2}

НАО «Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина»,

²ТОО «БИО-КАТУ», 010011

Аннотация

Актиномицеты широко распространены в почве и составляют значительную часть почвенной микрофлоры. Выделение этих организмов из почвенных источников необходимо, во-первых, для изучения их экологии и распространения в естественной среде, а во-вторых, для скрининга промышленно-значимых штаммов с целью их применения в сельском хозяйстве и фармацевтике. Представители рода *Actinomycetes Streptomyces* уже давно признаны в качестве плодовых продуцентов полезных биологически активных соединений широкого спектра. В данной статье изложены результаты изучения видового разнообразия актиномицетов, выделенных из почв Северного Казахстана. Отобранным штаммам актиномицетов была дана оценка их целлюлозолитической активности с последующей генетической идентификации на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК. Было показано, что большинство выделенных штаммов актиномицетов в природных условиях Северного Казахстана обладают целлюлозолитической активностью. В результате генетического анализа 19 активных штаммов актиномицетов выявлено, что в почвах Северного Казахстана доминируют актиномицеты, принадлежащие к роду *Streptomyces*. На засоленных почвах распространены такие виды, как *S. cirratus*, *S. parvus* и *S. xantholiticus*; в темно-каштановых почвах - *S. sindenensis*, *S. microsporus*, *S. badius*, *S. pratensis*, *S. staurosporininus*, *S. griseus*; в черноземах - *S. ambofaciens*, *S. auratus*, *S. natalensis* и *S. platensis*. Выделенные штаммы дополнили коллекцию микроорганизмов лаборатории биотехнологии с целью создания на их основе биопрепаратов для фитозащиты, ростстимуляции и переработки органических отходов.

Ключевые слова: актиномицеты, сельскохозяйственные культуры, целлюлолитическая активность, почвенные микроорганизмы, геномный анализ 16SrRNA.

Введение

Актиномицеты являются грамположительных важной группой нитевидных микроорганизмов, которые широко

распространены в различных местах обитания и являются деструкторами органических веществ в природе, стимуляторами роста растений, а также производителями антибиотиков и внеклеточных ферментов, такие как целлюлазы, хитиназы, ксиланазы, пептидазы, протеазы, амилазы, пектиназы, гемицеллюлазы и кератиназы [1]. Кроме того, их рост, в виде ветвления гифы, хорошо приспособлен к механизму проникновения и тем самым оказывают помощь в деградации лигноцеллюлозы. Целлюлазы актиномицетов - это индуцируемые внеклеточные ферменты, которые могут быть получены в ходе их роста на целлюлозных материалах - субстратах [2]. Актиномицеты являются одними из важных микробиологических сообществ в значительной степени ответственные за деградацию целлюлозы, источниками которой служат растения. Порядок *Actinomycetales* включает в себя ряд родов, которые содержат виды, активно разрушающие целлюлозу. Последние, в свою очередь, могут быть разделены на мезофильные и факультативные термофильные виды. Были изучены целлюлазы, полученные из двух термофильных штаммов *Microbispora bispora* и *Thermomonospora fusca*. Фракционирование *M. bispora* целлюлазы определяется шестью различными ферментами [3]. Термостойкие и термофильные актиномицеты играют важную роль в компостировании растительных остатков, где они осуществляют разложение растительных

полимеров. В результате исследований было обнаружено, что виды *Thermomonospora* имеют весьма высокую целлюлозаразрушающую активность. Целлюлазы, выделяемые этими организмами многочисленны и классифицируются как внеклеточные экзо- и эндонуклеазы с оптимальной температурой от 60°C до 70°C, и оптимальной pH около 6. Было также показано, что *Thermomonospora fusca* может преобразовать высокоцеллюлозные малолигнинные отходы целлюлозного комбината в одноклеточный белок, который является белковым продуктом с высокой питательной ценностью и используется в качестве пищевой добавки в рационе цыплят [4].

Благодаря своей способности продуцировать энзимы они способны разрушать органические растительные остатки, лигнин и хитин. Актиномицеты так же нашли широкое применение в создании компостной закваски, предназначенной для ускоренной утилизации любых растительных остатков и получения из них высококачественного компоста. В частности используются такие виды стрептомицетов как *S. griseus*, *S. termoviolaceus*, *S. globisporus*, *S. ruber* и *S. viridosporus*, характеризующиеся высокой способностью к деградации хитина, лигнинных соединений, лигноцеллюлозного комплекса, а также пероксидазной, полифенолоксидазной, ксиланазной, фенолальдегидоксидазной активностями [5].

Почвенные актиномицеты способны к образованию антибиотиков, пигментов, а также таких соединений как геосмин, аргосмин, муцидон, 2-метилизоборнеол, обуславливающих запахи почвы и воды [6]. Актиномицеты продуцируют широкий спектр антибиотиков различных групп: аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентомицин), макролиды (эритромицин, олеандромицин), полиеновые (нистатин, леворин), полипептиды, актиномицины, противоопухолевые препараты и др. В последние годы увеличилось число сообщений о новых антибиотиках, продуцируемых актиномицетами [7]. Синтез антибиотиков характерен для представителей практически всех родов актиномицетов, в особенности, таких как *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangiaceae* [8]. Они за счет биологически активных веществ положительно влияют на урожайность сельскохозяйственных культур.

В настоящее время растет внимание мировой научной общественности к созданию и широкому внедрению в промышленное растениеводство биологических средств защиты растений и биоудобрений. Система защиты растений от вредителей и болезней с преимущественным использованием химических препаратов привела к возникновению санитарно-гигиенических и экономических

проблем. Ухудшается экологическая обстановка: загрязняются атмосфера, вода, почва и продукция ядовитыми веществами. В связи с этим очевидна важность расширения исследовательских работ в направлении поиска полезных, биологически активных микробов, растительных субстратов и создания на их основе высокоэффективных и безопасных биопрепаратов и биоудобрений.

Актиномицеты широко известны как антагонисты возбудителей болезней человека, животных и растений. Среди них выявлены продуценты многих антибиотиков, в первую очередь аминогликозидов и макролидов, новых антибиотиков макваримицидов и других биологически активных веществ. Помимо антибиозиса, для актиномицетов характерен и другой механизм антагонизма – лизис клеток, который обусловлен способностью мицелиальных прокариот синтезировать ферменты хитиназу и глюканазу [9]. Несмотря на широкий метаболический потенциал актиномицетов, эффективность расселения их спор, устойчивость к высушиванию и временному отсутствию питательных веществ, количество препаратов на основе актиномицетов для растениеводства, остается до сих пор ограниченным.

В последние годы для идентификации актиномицетов в микробных сообществах различных природных субстратов, в первую очередь почв, используются молекулярно-биологические методы.

Молекулярным инструментом в этих методах является полимеразная цепная реакция (ПЦР) амплификации различных районов генов, кодированных в 16S рРНК (16SpДНК) путем использования праймеров, гомологичных консервативным районам гена. С помощью молекулярно-биологических методов, в частности метода ПЦР в лесной почве умеренных широт были обнаружены представители рода *Actinomadura*. С использованием ПЦР разработан быстрый метод идентификации штаммов рода *Saccharomonospora* [10].

Актиномицеты в настоящее время широко изучаются в

Материалы и методы исследований

Объект исследования: выделенные из почвы Северного Казахстана культуры актиномицетов.

Оценка целлюлозолитической активности актиномицетов

Отобранные штаммы изолятов были культивированы при 25°C - 150 об/мин в среде Гетчинсона-Клейтона для производства ферментов состоящей из (г/л): KH_2PO_4 – 1; CaCl_2 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,1; FeCl_2 – 0,01; NaNO_3 – 2,5; дистиллированная вода 1 л, содержащая бумажную фильтровальную бумагу Ватман №1 (Полоса 1 × 6 см, 0,05 г на 20 мл). рН 6,8-7,2. На 3-е сутки инкубационного периода биомассу актиномицетов подвергали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Супернатант собирали и хранили в

различных странах. Принципиальным отличием идеи нижеприведенной научно-исследовательской работы является изучение биологии и экологии почвенных актиномицетов, выявление новых видов актиномицетов – продуцентов биологически активных веществ для создания новых биопрепаратов против болезней сельскохозяйственных культур на основе антагонистов-актиномицетов, новых биоудобрений для повышения плодородия и гумусообразующих процессов в почве в северном регионе Казахстана. В работе использованы культуры, выделенные из местных почв.

виде сырого ферментного препарата при 4°C для дальнейшего анализа ферментов. Гранулы, полученные после центрифугирования культуральной жидкости, подвергали гравиметрическому анализу для определения остаточной целлюлозы фильтровальной бумаги [11].

Идентификация актиномицетов была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности 16S рРНК

Условия культивирования и выделения ДНК. Хромосомная ДНК была изолирована, используя коммерческий кит, «миниприготовление бактериальной геномной ДНК» [12].

16S рДНК секвенирование. 16S рРНК гены (рДНК) были амплифицированы с использованием

универсальных праймеров 8f 5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 и 806R- 5' GGACTACCAGGGTATСТААТ в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг ДНК, 1 Ед Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) и была запрограммирована в следующем порядке: длительная денатурация 95°C в течение 5 минут; 34 цикла: 95°C – 15 секунд, 52°C – 30 секунд, 72°C – 30 секунд; заключительная элонгация 7 минут при 72°C. После, продукты ПЦР были подвергнуты электрофорезу на 2% агарозном геле в 1×TE буфере, затем окрашены с помощью этидия бромиды и были визуализированы с помощью ультрафиолетового света.

Очистку ПЦР продуктов от не связавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [13-14]. Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Нуклеотидные последовательности 16S рРНК гена идентифицируемых культур были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества) что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью более 650 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Филогенетический анализ. Литературные данные [15-16] свидетельствуют о наличии в международных банках нуклеотидных последовательностей Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), ошибок, мы дополнительно провели построение филогенетического дерева с нуклеотидными последовательностями 16S рРНК гена референтных штаммов данных видов. Также в анализ были включены нуклеотидные последовательности 16S рРНК гена наиболее филогенетически связанных микроорганизмов [17].

Построение филогенетического дерева проводили с использованием программного обеспечения Mega 3.1 [18], выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм Clustal W,

построение филогенетического дерева проводили с использованием

метода ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ).

Результаты исследования и обсуждение

Целлюлозолитическая активность почвенных актиномицетов

Изучена целлюлозолитическая активность 36 штаммов почвенных актиномицетов (таблица 1). Выявлено, что 41,7% изученных актиномицетов обладают высокой целлюлозолитической активностью. Для 11,1% штаммов характерна средняя активность, 30,6% штаммов от общего количества штаммов слабо разлагают нативную форму

целлюлозы. Штаммы №14, 15, 30, 40, 50, 51 не способны продуцировать целлюлазу (16,6%).

Ферментативная производительность и виды деятельности актиномицетов определяются влиянием основных факторов окружающей среды, такие как температура, солености и pH. В связи с этим нами было изучено влияние физиологических факторов на рост целлюлотических культур актиномицетов.

Таблица 1 - Целлюлозоразрушающие свойства почвенных актиномицетов

| Штамм | Ферментативная активность |
|---------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|
| Шт. №1 | +++ | Шт. №13 | +++ | Шт. №30 | --- | Шт. №46 | +++ |
| Шт. №2 | --- | Шт. №14 | +++ | Шт. №31 | --- | Шт. №47 | --- |
| Шт. №3 | +++ | Шт. №15 | --- | Шт. №37 | --- | Шт. №48 | --- |
| Шт. №5 | --- | Шт. №16 | --- | Шт. №38 | +++ | Шт. №49 | +++ |
| Шт. №7 | +++ | Шт. №17 | +++ | Шт. №40 | --- | Шт. №50 | --- |
| Шт. №8 | +++ | Шт. №18 | +++ | Шт. №42 | --- | Шт. №51 | --- |
| Шт. №9 | --- | Шт. №20 | +++ | Шт. №43 | --- | Шт. №54 | +++ |
| Шт. №11 | --- | Шт. №28 | --- | Шт. №44 | --- | Шт. №55 | +++ |
| Шт. №12 | --- | Шт. №29 | --- | Шт. №45 | +++ | Шт. №59 | +++ |

Примечание - +++ – высокая активность, +- – средняя, - – слабая, --- – отсутствует

Генотипирование новых штаммов почвенных актиномицетов

В нашем исследовании использовались различные методы предварительной подготовки и селективные среды для изоляции актиномицетов из солончаков, солонцов, черноземов и темно-каштановых почв Северного Казахстана. В результате тестирования на ростстимулирующую активность были отобраны 16 активных культур - ростстимуляторов сельскохозяйственных культур. Штаммы под номерами 3, 5 и 7 выделены из засоленных почв Целиноградского района, штаммы 11, 12, 13, 15, 16, 28 и 35 были изолированы из различных подвидов темно-каштановых почв Аккольского и Аршалинского районов, штаммы с номерами 40, 41, 42, 43 и 44 были выделены из черноземов Шортандинского и Аккольского районов Акмолинской

области. В дальнейшем были генотипированы для идентификации видового разнообразия актиномицетов.

Также были идентифицированы целлюлозолитически активные штаммы: №31, 54, 55.

Результат идентификации культур актиномицетов методом анализа фрагмента 16S рРНК гена могут быть использованы, как молекулярно-биологическая характеристика штаммов и крайне важны для таксономических исследований. 16S rRNA была амплифицирована с помощью метода ПЦР сTaq DNA Polymerase и праймерами 8f и 806R.

Геномная ДНК выделялась из чистых культур с использованием набора «ДНК сорб-В» (Амплиценс, Россия) согласно инструкции производителя, показано на примере целлюлозоразрушающих актиномицетов (таблица 2).

Таблица 2 - Концентрация ДНК целлюлозолитически активных актиномицетов

| Наименование | Концентрация ДНКng/ul | A260 | A280 | 260/280 |
|--------------|-----------------------|-------|-------|---------|
| Шт. №31 | 10,15 | 0,203 | 0,123 | 1,65 |
| Шт. №54 | 17,3 | 0,346 | 0,219 | 1,58 |
| Шт. №55 | 19,64 | 0,393 | 0,238 | 1,65 |

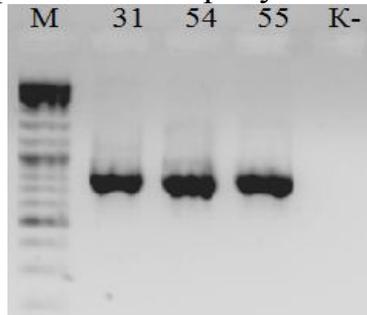
Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATСТААТ в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 25 нг ДНК, 1 Ед Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase

(Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 5 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C - 40 секунд, 72°C – 50 секунд; заключительная

элонгация 10 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Результаты

ПЦР амплификации приведены на рисунках 1 и 2.



Обозначения: (31, 54, 55) образцы, (M) маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н., от 100-1000 шаг 100 п.н.), (K-) отрицательный контрольный образец;

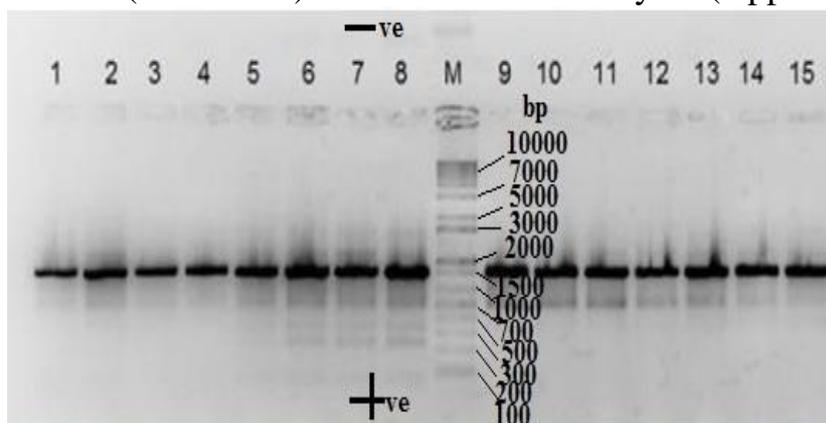
Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента 16S rRNA гена ДНК целлюлолитических культур актиномицетов

Как видно на рисунках 1 и 2 у всех образцов были амплифицированы специфические фрагменты молекулярной массой около 800 п.н.

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от не связавшихся праймеров проводили, ферментативным методом используя Exonuclease I (Fermentas) и

щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [13].

Реакцию секвенирование проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).



Обозначения: (1-15) образцы, (M) маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н., от 100-1000 шаг 100 п.н.);

Рисунок 2 - Электрофореграмма ПЦР - продуктов амплификации фрагмента 16S рРНК гена ДНК ростстимулирующих актиномицетов (15 образцов)

Анализ нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqMan (DNA Star). После чего были удалены концевые фрагменты

(нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества). Полученные последовательности были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Результаты приведены в таблице 3 (кроме шт. №55).

Таблица 3 - Результаты идентификации методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA

| № штамма | Инвентарный номер GeneBank (Accession number) | Наименование штамма | % совпадения |
|----------|---|--------------------------------------|--------------|
| 3 | NR_043356.1 | <i>Streptomyces cirratus</i> | 99 |
| 4 | HF585543.1 | <i>Streptomyces luridus</i> | 99 |
| 5 | KP895570.1 | <i>Streptomyces parvus</i> | 99 |
| 7 | LN774413.1 | <i>Streptomyces xantholiticus</i> | 100 |
| 11 | KP262503.1 | <i>Streptomyces sindenensis</i> | 100 |
| 12 | AB184459.2 | <i>Streptomyces microsporus</i> | 100 |
| 13 | KT191165.1 | <i>Streptomyces badius</i> | 99 |
| 15 | KM186629.1 | <i>Streptomyces pratensis</i> | 99 |
| 16 | <u>NR_108502.1 </u> | <i>Streptomyces staurosporininus</i> | 100 |
| 28 | <u>KP058482.1 </u> | <i>Streptomyces sindenensis</i> | 100 |
| 35 | <u>KJ623766.1 </u> | <i>Streptomyces griseus</i> | 99 |
| 40 | <u>EU841656.1 </u> | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | 100 |
| 41 | KF475886.1 | <i>Streptomyces sioyaensis</i> | 100 |
| 42 | KC152947.1 | <i>Streptomyces auratus</i> | 100 |
| 43 | AB184356.2 | <i>Streptomyces natalensis</i> | 99 |
| 44 | <u>EU676184.1 </u> | <i>Streptomyces platensis</i> | 99 |
| 31 | <u>KT363055.1</u> | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | 100 |
| 54 | <u>KT363055.1</u> | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | 100 |

Принимая во внимание литературные данные [13-14, 16]

свидетельствующие о наличии в международных банках

нуклеотидных последовательностей GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), ошибок, мы дополнительно проводили построение филогенетических деревьев с нуклеотидными последовательностями *16S rRNA* гена референтных штаммов данных

видов (<http://www.bacterio.net>). Также в анализ были включены нуклеотидные последовательности *16S* рРНК гена наиболее филогенетически связанных микроорганизмов [17]. Результаты идентификации 19 штаммов по фрагменту *16S rRNA* гена приведены на филогенетическом дереве (рисунок 3 и 4).

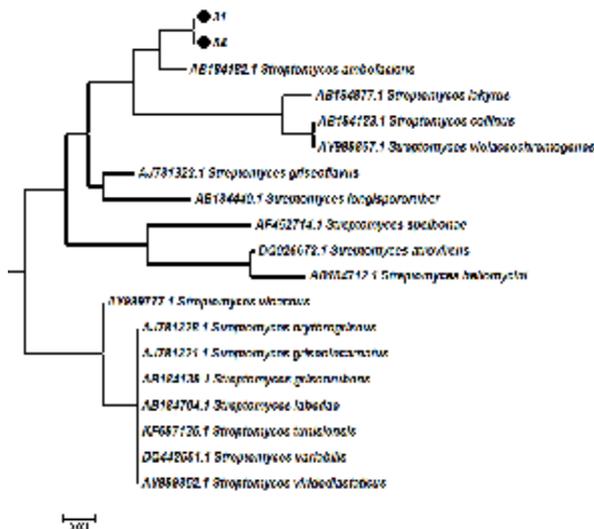


Рисунок 3 – Фрагмент филогенетического дерева целлюлозоактивных штаммов, построенного на основании анализа фрагмента гена *16S rRNA* *Streptomyces* spp.

Таким образом, на основании анализа нуклеотидной последовательности в BLAST и построении филогенетического дерева, анализируемые новые штаммы целлюлозоразрушающих актиномицетов №31 и №54

идентифицированы как *Streptomyces ambofaciens*.

На рисунке 4 представлено древо ростстимулирующих актиномицетов.

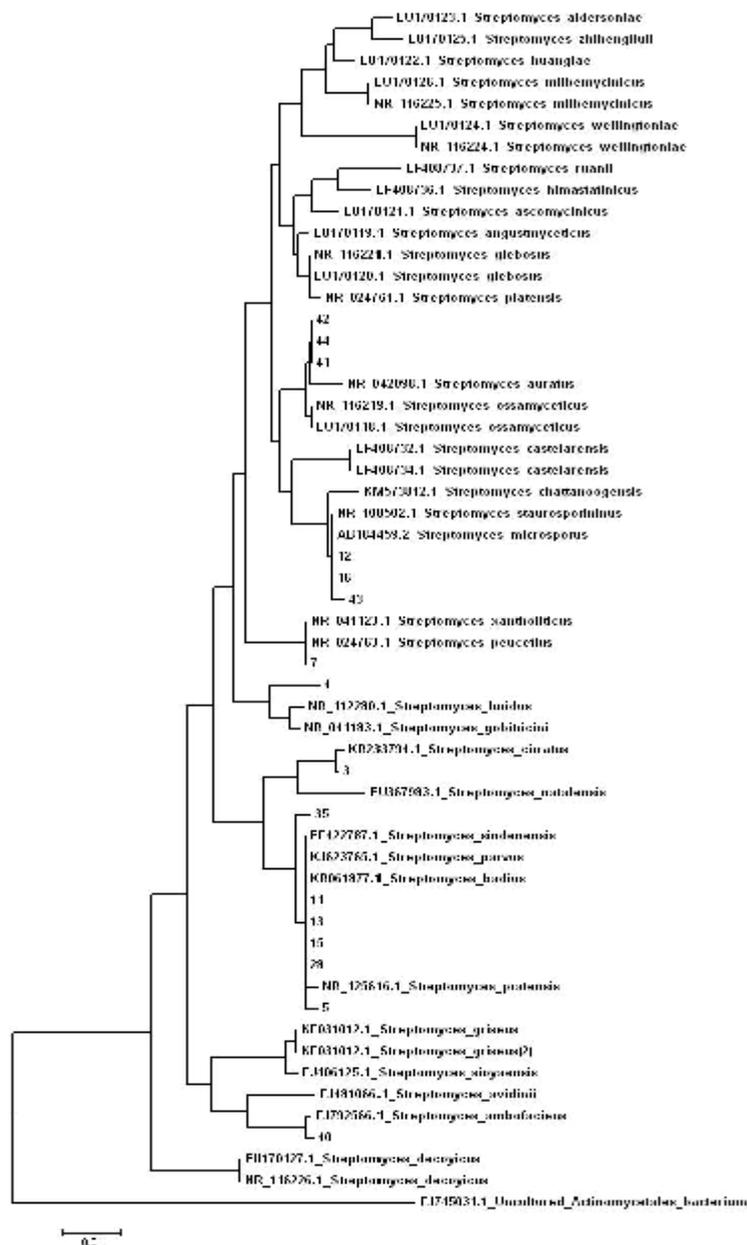


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево ростстимулирующих штаммов, построенное на основании анализа фрагмента гена 16S рНК группы *Streptomyces sp.*

Как показано на рисунке три штамма 42, 44, 41, идентифицируемые как *Streptomyces auratus* при идентификации в GeneBank находятся на одной филогенетической ветви с *Streptomyces auratus*. Однако штаммы под № 41 и № 44 с большей вероятностью принадлежит к видам *Streptomyces sioyaensis* и *Streptomyces platensis* относительно,

к которым и были отнесены ранее (таблица 11). Далее, шт. 12 - *Streptomyces microsporus*, шт. 3 как *Streptomyces cirratus*, шт. 4 как *Streptomyces luridus*, тогда как шт. 40 как *Streptomyces ambofaciens*. Согласно филогенетическому дереву, шт. 7 может идентифицироваться как *Streptomyces xantholiticus*, либо *Streptomyces peucetius*, однако анализ

нуклеотидной последовательности гена со 100% вероятностью относит этот штамм к *Streptomyces xantholiticus*. Основываясь на процентном совпадении последовательности фрагмента 16S рРНК гена и нуклеотидной последовательности представленной в международной базе данных, шт. 11 отнесен к виду *Streptomyces sindenensis*, шт. 13 к *Streptomyces badius*, тогда как шт. 35 к *Streptomyces griseus*. Штамм под номером 5 был идентифицирован как *Streptomyces parvus*, штамм 28

Заключение

Актуальными направлениями научных исследований в области биологизации сельскохозяйственного производства в настоящее время является изучение механизмов устойчивости целевых объектов, поиск подходов к совершенствованию технологий производства и применения биологических средств защиты растений от болезней и вредителей. Новый подход предполагает создание систем комплексной микробиологической защиты растений от болезней.

При изучении целлюлозолитической активности установлено, что из 36 штаммов почвенных актиномицетов 41,7% обладают высокой целлюлозолитической активностью. Новые 2 штамма целлюлозоразрушающих актиномицетов, идентифицированных методами геномной инженерии, отнесены к виду *Streptomyces ambofaciens*.

Геномному анализу были

как *Streptomyces sindenensis*, в то время как штамм 15 был отнесен к виду *Streptomyces pratensis*. Идентификация штаммов 16 и 43 относит их к таким видам, как *Streptomyces staurosporininus* и *Streptomyces natalensis* относительно. В дополнение к методу генотипирования, также был произведен анализ культурально-морфологических признаков выделенных актиномицетов, что также подтверждает их принадлежность к данной таксономической группе.

подвержены 19 отселектированных штаммов актиномицетов по ростостимулирующим и целлюлолитическим свойствам в отношении сельскохозяйственных культур. В результате исследования выявлено, что в почвах Северного Казахстана доминируют актиномицеты, принадлежащие к роду *Streptomyces*. На засоленных почвах распространены такие штаммы, как *S. cirratus*, *S. parvus* и *S. xantholiticus*, выделенные из почв Целиноградского района. Такие виды как *S. sindenensis*, *S. microsporus*, *S. badius*, *S. pratensis*, *S. staurosporininus* и *S. griseus* были широко распространены в различных подвидах темно-каштановых почв Аккольского и Аршалинского районов. В черноземных почвах Шортандинского и Аккольского районов Акмолинской области часто встречаются такие виды *Streptomyces*, как *ambofaciens*, *auratus*, *natalensis* и *platensis*.

Настоящая публикация

осуществлена в рамках Подпроекта «Разработка технологии переработки птичьего помета в органическое биоудобрение с помощью новых отечественных биопрепаратов и их внедрение в растениеводство»,

финансируемого в рамках Проекта «Стимулирование продуктивных инноваций», поддерживаемого Всемирным Банком и Правительством Республики Казахстан.

Список литературы

1 Das P. et al. Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats // International journal of advance biotechnology and research. – 2014. – Vol.5, № 3. – P. 438-451.

2 Prasad P. Enzymatic screening and characterization of cellulolytic actinomycetes isolated from soil samples collected from Patna district in Bihar, India // International Journal of Current Research and Academic Review. – 2014. – Vol. 2, № 10. – P. 60-70.

3 Wilson D.B. Biochemistry and genetics of actinomycetecellulases // Crit. Review Biotechnology. – 1992. – №12(1-2). – P. 45-63.

4 Kumar A., Bohra C. and Singh L. Environment Pollution and Management. - New Delhi: A.P.H. Publishing Corporation, 2003. – P. 50-72.

5 Chanal A., Chapon V., Benzerara K. et al. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8, №3. – P. 514-525.

6 Norovsuren Zh., Zenova G.M., Mosina L.V. Actinomycetes v rizosphere rasteniy polupustinyh pochv Mongoli. – M.: Izdatelstvo Nauka, 2007. – №4. – P. 457-460.

7 Buyantuyev A., Wu J. Urban heat islands and landscape heterogeneity: linking spatiotemporal variations in surface temperatures to land-cover and socioeconomic patterns // Landscape Ecology. – 2010. – Vol. 25, – P. 17-33.

8 Lazzarini A, Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics // Antonie van Leeuwenhoek. – 2000. – Vol. 78, № 3–4. – P. 399-405.

9 Емцев В.Т. Почвенные микробы и деградация ксенобиотиков // Перспективы развития почвенной биологии / под ред. Д. Г. Звягинцев. – М., 2001. – С. 77-78.

10 Novinscak A., Surette C., Allain C., Filion M. Application of molecular technologies to monitor the microbial content of biosolids and composted biosolids // Water Sci. Technol. – 2008. – Vol. 57, №4. – P. 471-477.

11 Tailliez P., Girard H., Millet J., Beguin P. Enhanced cellulose fermentation by an asprogenous and ethanol tolerant mutant of *Clostridium thermocellum* // Applied Environmental Microbiology. – 1989. - Vol. 55, – P. 207–211.

12 Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001. – P. 241-245.

13 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. – 1994. –

Vol. 22, – P.4354-4355.

14 Zhang Q., Kennon R., Koza M. A. et al. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, – P.1134-1139.

15 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S. et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45, – P.595-599.

16 Clarridge III J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 17, – P.840-862.

17 Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and Metabolism of *Lactobacillus*. *Lactobacillus* molecular biology from Genomics to Probiotics. – Norfolk UK: Caister Academic Press, – 2009. – 206 p.

18 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150-163.

19 Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* // Archives of Microbiology. – 2001. – Vol. 176, № 5. – P. 386-390.

References

1 Das P. et al. Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats // International journal of advance biotechnology and research. – 2014. – Vol.5, № 3. – P. 438-451.

2 Prasad P. Enzymatic screening and characterization of cellulolytic actinomycetes isolated from soil samples collected from Patna district in Bihar, India // International Journal of Current Research and Academic Review. – 2014. – Vol. 2, № 10. – P. 60-70.

3 Wilson D.B. Biochemistry and genetics of actinomycetecellulases // Crit. Review Biotechnology. – 1992. – Vol. 12, № 1-2. – P. 45-63.

4 Kumar A., Bohra C. and Singh L. Environment Pollution and Management. - New Delhi: A.P.H. Publishing Corporation, 2003. – P. 50-72.

5 Chanal A., Chapon V., Benzerara K. et al. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8, №3. – P. 514-525.

6 Norovsuren Zh., Zenova G.M., Mosina L.V. Actinomycetes v rizosphere rasteniy polupustinyh pochv Mongoli. – M.: Izdatelstvo Nauka, 2007. – №4. – P. 457-460.

7 Buyantuyev A., Wu J. Urban heat islands and landscape heterogeneity: linking spatiotemporal variations in surface temperatures to land-cover and socioeconomic patterns // Landscape Ecology. – 2010. – Vol. 25, – P.17-33.

8 Lazzarini A, Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics // Antonie van Leeuwenhoek.

– 2000. – Vol. 78, № 3–4. – P. 399-405.

9 Yemtsev V.T. Pochvenie mikroby I degradasiya ksenobiotikov//Perspektivi razvitiya pochvennoy biology/ pod red. D. G. Zvyagintsev. – M., 2001. – P. 77-78.

10 Novinscak A., Surette C., Allain C., Filion M. Application of molecular technologies to monitor the microbial content of biosolids and composted biosolids // Water Sci. Technol. – 2008. – Vol. 57, № 4. – P. 471-477.

11 Tailliez P., Girard H., Millet J., Beguin P. Enhanced cellulose fermentation by an asprogenous and ethanol tolerant mutant of *Clostridium thermocellum* // Applied Environmental Microbiology. – 1989. - Vol. 55, – P. 207–211.

12 Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001. – P. 241-245.

13 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // Nucleic Acids Res. – 1994. – Vol. 22, – P.4354-4355.

14 Zhang Q., Kennon R., Koza M. A. et al. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40, – P.1134-1139.

15 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S. et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45, – P.595-599.

16 Clarridge III J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. – Vol. 17. – P.840-862.

17 Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and Metabolism of *Lactobacillus*. *Lactobacillus* molecular biology from Genomics to Probiotics. – Norfolk UK: Caister Akademik Press, – 2009. – 206 p.

18 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150-163.

19 Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* // Archives of Microbiology. – 2001. – Vol. 176, Is. 5. – P. 386-390.

**СОЛТҮСТІК ҚАЗАҚСТАННЫҢ ӘРТҮРЛІ ТИПТІ
ТОПЫРАҚТАРЫНАН БӨЛІП АЛЫНҒАН АКТИНОМИЦЕТТЕРДІҢ
АЛУАНТҮРЛІЛІГІ**

*А.П.Науанова^{1,2}, Д.М. Ернашева²,
Г.С. Шахабаева², А.Е. Ермеков^{1,2}*

¹ АҚ «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті»,
² “БИО-КАТУ” ЖШС

Түйін

Солтүстік Қазақстан топырақтарынан бөліп алынған актиномицеттердің алуан түрлігі зерттелген. Солтүстік Қазақстан топырақтарынан бөліп алынған көптеген актиномицеттерге табиғи жағдайда целлюлозалық белсенділік тән. Целлюлозалық белсенділігі және ауыл шаруашылығы өсімдіктерінің өсуді ынталандыру бойынша іріктеп алынған 19 актиномицет штамдарына геномдық талдау жүргізілді. Зерттеу нәтижесінде Солтүстік Қазақстан топырақтарында *Streptomyces* туысына жататын актиномицеттердің басым екені анықталды. Сортаң топырақтарда *S. cirratus*, *S. parvus* және *S. xantholiticus* сияқты түрлер таралса; қоңыр-қара топырақта - *S. sindenensis*, *S. microsporus*, *S. badius*, *S. pratensis*, *S. staurosporininus*, *S. griseus*; қара топырақтарда - *S. ambofaciens*, *S. auratus*, *S. natalensis* и *S. platensis* таралғаны анықталды.

Бөлініп алынған актиномицет штамдары топырақтағы өсімдік қалдықтырын ыдыратып, оның құнарлығын арттыруда пайдаланылатын биопрепараттар жасауға қолданылады.

Кілт сөздер: актиномицеттер, ауыл шаруашылығы дақылдары, целлюлозалық белсенділігі, топырақ микроағзалары 16SrRNA геномдық талдау.

SPECIES DIVERSITY OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM VARIOUS SOILS OF NORTHERN KAZAKHSTAN

*A.^{1,2}Nauanova, ²D.Yerpasheva,
G. ²Shakhabayeva, A.^{1,2}Yermekov*

¹*NJSC "S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University", the Republic of Kazakhstan*
²*LLP "BIO-KATU"*

Summary

This article explores species diversity of actinomycetes isolated from soils of Northern Kazakhstan. Most of the selected strains of actinomycetes possess cellulolytic activity in the natural conditions of Northern Kazakhstan. 19 selected strains of actinomycetes were subjected to genomic analysis by growth promoting and cellulolytic properties in relation to crops. The study revealed that actinomycetes belonging to the genus *Streptomyces* dominate in the soils of Northern Kazakhstan. Species such as *S. cirratus*, *S. parvus* and *S. xantholiticus* are common in saline soils; in dark chestnut soils – *S. sindensis*, *S. microsporus*, *S. badius*, *S. pratensis*, *S. staurosporininus*, *S. griseus*; in chernozems – *S. ambofaciens*, *S. auratus*, *S. natalensis* and *S. platensis*.

The isolated strains of actinomycetes will be utilized to create biological products used to decompose plant residues in the soil in order to increase its fertility.

Key words: actinomycetes, agricultural crops, cellulolytic activity, soil microorganisms, 16SrRNA genomic analysis.