

На правах рукописи

ЗАХАРОВА Ольга Семеновна

**АКТИНОМИЦЕТЫ РОДА АСТИНОМАДУРА
В ПОЧВАХ РАЗНЫХ ТИПОВ**

Специальность 03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА 2003 г.

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Г.М. Зенова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
А.Н. Лихачев
кандидат биологических наук,
Т.А. Бабич

Ведущее учреждение: Московская сельскохозяйственная академия
им. К.А. Тимирязева

Защита диссертации состоится 16 декабря 2003 г. в 15 час. 30 мин. в
аудитории М-2 на заседании Диссертационного совета К.501.001.05 при МГУ
им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета почвоведения МГУ.

Автореферат разослан « » _____ 2003 г.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании
Диссертационного совета. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим
направить по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ им. М.В.
Ломоносова, факультет почвоведения, Ученый совет.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук



Л.М. Полянская

2003-A
18302

Актуальность темы

В настоящее время группа актиномицетов и родственных им микроорганизмов объединяет более ста родов (Stackebrandt et al., 1997). Традиционно считается, что в почве наиболее распространены представители родов *Streptomyces* и *Micromonospora*, однако применение селективных методов выделения актиномицетов из почвы позволяет выявить в почве представителей редких родов, в том числе и рода *Actinomadura*.

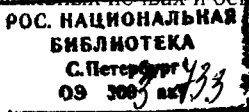
Актиномадуры впервые были выделены из клинического материала, их традиционно считали редко встречающимися в почве актиномицетами. После обнаружения среди представителей рода продуцентов редких антибиотиков, эти актиномицеты начали интенсивно изучаться актиномицетологами с целью поиска антибиотически активных штаммов. Было выполнено большое число исследований (таксономический состав рода постоянно изменялся), были выделены новые продуценты противоопухолевых антибиотиков, антибиотиков резерва, ферментов (более 40 веществ). Однако исследования, направленные на поиск биологически активных штаммов, не решали экологических проблем, и вопросы экологической диагностики рода *Actinomadura* оставались открытыми.

Род *Actinomadura* (25 видов) (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994) до сих пор представляет собой гетерогенный таксон актиномицетов, в большинстве своем почвенных сапротрофов, близких по своим морфологическим, физиологическим и хемотаксономическим свойствам представителям таких родов, как *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Actinocorallia* и *Microbispora* (Kroppenstedt et al., 1990, Zhang et al., 1998, Zhang et al., 2001). Решающими родовыми дифференцирующими признаками являются состав клеточных жирных кислот, менахинонов и последовательности 16S и 23S рПНК. Нам представляется целесообразным объединить эти роды в группу родов актиномицетов, близких роду *Actinomadura*, как на основании их филогенетического родства, так и на основании схожести их морфологических и физиологических характеристик.

Цель работы - выявление закономерностей распространения актиномицетов рода *Actinomadura* в наземных экосистемах и составление их экологической характеристики.

Задачи исследования:

1. Разработка комплексных методов для селективного выделения актиномадур и близких им родов из почв и растительных субстратов.
2. Изучение закономерностей распространения группы актиномицетов рода *Actinomadura* в зональных и интразональных почвах и основных типах биогеоценозов.



3. Определение места актиномадур среди других актиномицетов в микробной сукцессии в почве.
4. Установление структуры популяций (споры-мицелий) представителей рода *Actinomadura* в почве.

Научная новизна

Предложен комплексный метод для селективного выделения из почвы представителей рода *Actinomadura*^{*} и для экологической оценки этих актиномицетов в почвенном актиномицетном комплексе.

Впервые показано, что актиномадур - минорный, но постоянный компонент почвенных актиномицетных комплексов. Они приурочены к органогенным горизонтам почв, субстратам, богатым растительными остатками (напочвенный ярус) и не обнаружены на поверхности растений. Встречаемость актиномадур в почвах увеличивается при движении от северных почв к южным, достигая максимума в черноземах и сероземах.

Использование сукцессионного анализа позволило проследить за динамикой популяционной плотности актиномадур на фоне динамики популяций других актиномицетных родов и выявить наиболее благоприятные для выделения актиномадур временные периоды и условия. Ранние сроки сукцессии наиболее благоприятны для выделения актиномадур из почвы при инициации сукцессии увлажнением до уровня, близкого к точке завядания (ВЗ) (-3 атм).

Впервые исследована структура популяций актиномадур (споры-мицелий). Установлено, что споры исследованного штамма *Actinomadura coerulea* в почве прорастают быстрее, чем споры штамма *Streptomyces xanthochromogenus*, однако развитие проростков происходит медленнее, по сравнению со стрептомицетами. Популяции актиномадур в почве представлены спорами в большей степени, чем мицелием

Практическая значимость

Выявление закономерностей распространения актиномадур в почве обогащает наши знания о биоразнообразии микробного мира в целом и разнообразии почвенных актиномицетов в частности, и вносит вклад в разработку способов его сохранения.

Данные, полученные в ходе исследования динамики популяционной плотности актиномадур в ходе микробной сукцессии в почве и при изучении распределения этих актиномицетов по ярусам биогеоценозов и горизонтам почв, дают возможность оптимизировать процедуру поиска штаммов-продуцентов биологически активных веществ, а также позволяют по-

^{*} - здесь и далее в понятие «род *Actinomadura*» включены актиномицеты видов, входящих в этот род на данный момент (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994), и видов, исключенных из него и перенесенных в роды *Abioturraea*, *Actinocorallia*

дойти к проблеме управления поведением интродуцированных популяций непосредственно в почве.

Апробация работы

Основные положения работы доложены на международных конференциях: IXth International congress of bacteriology and applied microbiology (Sydney, Australia, 1999), «Ломоносов-99», «Ломоносов-2000», «Ломоносов-2001», «Биология - наука 21-о века. 5-я Пушинская конференция молодых ученых» (Пушино, 2001), XIth International Symposium on Biology of Actinomycetes (Vancouver, Canada, 2001), «Экология и биогеохимическая деятельность микроорганизмов» (Одесса, 2001), «Биология - наука 21-о века. 6-я Пушинская конференция молодых ученых» (Пушино, 2002), «Биогеография почв» (Сыктывкар, 2002), «Ломоносов-2003», «Биология - наука 21-о века. 7-я Пушинская конференция молодых ученых» (Пушино, 2003), а также на III съезде Докучаевского общества почвоведов (Суздаль, 2000) и на заседании кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ.

Публикации

Материалы диссертации изложены в 18 печатных работах.

Объем работы

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой биологии почв проф. д.б.н. академику РАЕН Звягинцеву Д.Г. за постоянное внимание к работе.

Автор благодарит проф. д.б.н. Судницина И.И., проф. д.б.н. Чернова И.Ю., д.б.н. Кожевина П.А. и к.б.н. Початкову Т.Н. за консультации и ценные советы.

Автор выражает признательность к.б.н. Лихачевой А.А. и всему коллективу кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова за сотрудничество и поддержку.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

В работе были использованы образцы различных почв основных почвенно-климатических зон России, Туркмении и Южного Вьетнама, интразональных почв и растительных субстратов из различных ярусов биогеоценозов (табл. 1). Таким образом, был проанализирован спектр зональных и некоторых интразональных почв, что позволило проследить закономерности распространения актиномадур в почвах основных типов биогеоценозов.

Методы исследования

Использование различных селективных приемов и их сочетаний - преобработки посевного материала (прогревание почвенных образцов при

Объекты исследования

<i>Экосистемы</i>	<i>Название почвы и тип растительности</i>	<i>Район отбора образцов</i>
<i>Лесные</i>	дерново-подзолистая (сведенный ельник-черничник)	Новгородская обл., Мошенской район
	дерново-грунтово-глебовая (ельник-черничник-зеленомошник)	Тверская обл., ЦЛГБЗ
	бурая лесная кислая грубогумусная (ельник сложный)	там же
	оторфованная подзолистая профильно-оглееная (ельник-черничник)	там же
	серая лесная окультуренная (широколиственный лес)	Тульская обл., заповедник «Тульские засеки»
	красная ферралитная почва (тропический лес)	Южные провинции Вьетнама
	желтая ферралитная почва (тропический лес)	там же
<i>Луговые</i>	аллювиально-луговая пойменная (злаково-разнотравно-бобовый луг на низкой пойме)	Калужская обл., пос. Сатино, правый берег р. Протва
	аллювиально-луговая пойменная (злаково-разнотравно-бобовый луг на высокой пойме)	там же
	дерново-луговая почва (разнотравный луг)	Смоленская обл.
	лугово-черноземная (разнотравно-злаковый луг)	Луганская обл., район Меловое
<i>Степные</i>	чернозем типичный (злаково-разнотравная степь)	Курская обл., заповедник «Алехинская степь»
	чернозем обыкновенный (разнотравно-злаковая степь)	Воронежская обл., заповедник "Каменная степь"
<i>Полупустынная</i>	серозем светлый (мятликово-полынная степь)	Юго-восточная Туркмения, хребет Куштанитау

120°C, прогревание почвенных суспензий при 60°C, фильтрование почвенных суспензий через ватный фильтр); посева на селективные среды (Гаузе 1, Гаузе 2, среда с пропионатом натрия, MGA-агар) с добавлением антибиотиков (рубомидина, карминоидина, стрептомицина, левомицитина, налидиксовой кислоты, нистатина, циклогексимида) - позволило подобрать несколько комплексных методов для выделения актиномадур из почвы (рис. 1). Селективные приемы были направлены на подавление роста грибов (нистатин и циклогексимид), истинных бактерий (налидиксовая кислота и прогревание почвы), а также банальных форм стрептомицетов (другие антибиотики, прогревание почв и почвенных суспензий). Сроки инкубирования посевов составляли 3-4 недели.

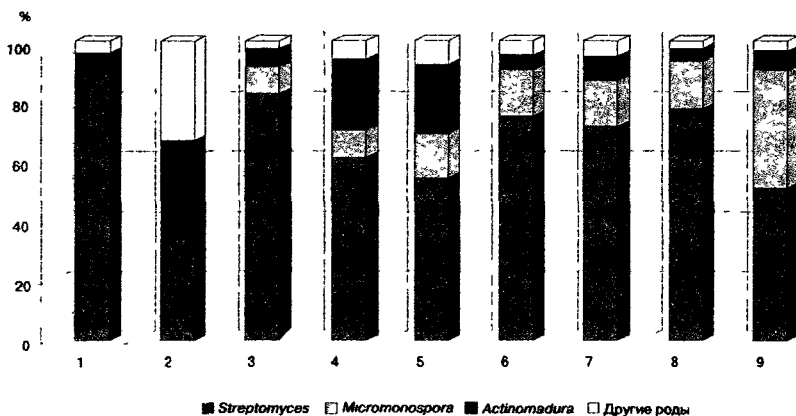


Рис. 1. Соотношение (%) разных родов в актиномицетных комплексах чернозема при использовании разных селективных приемов выделения: 1 - среда Гаузе 2 с нистатином, рубомицином и налидиксовой кислотой; 2 - среда Гаузе 1 с нистатином, рубомицином, налидиксовой кислотой; 3 - среда с пропионатом Na с нистатином, рубомицином, налидиксовой кислотой без предобработки посевного материала; 4 - среда с пропионатом Na с нистатином, рубомицином, налидиксовой кислотой и прогрев почвенной суспензии при 60°C 10 мин.; 5 - среда Гаузе 1 с нистатином, налидиксовой кислотой и прогрев почвенных образцов перед посевом при 120°C 1 ч.; 6 и 7 - среда Гаузе 1 с нистатином, циклогексимидом, налидиксовой кислотой и карминомицином 3,0 и 10 мкг/мл. 8 и 9 - среда с пропионатом натрия с нистатином, циклогексимидом, налидиксовой кислотой и карминомицином 1,5 и 5,0 мкг/мл

Для направленного поиска актиномадур в почве рекомендуется использовать посев предварительно прогретых почвенных образцов (120°C 1 ч) на среду Гаузе 1 с добавлением комплекса антибиотиков: нистатин (50 мкг/мл) и налидиксовая кислота (10 мкг/мл); или посев на ту же среду с добавлением комплекса селективных агентов (нистатин - 50 мкг/мл, налидиксовая кислота - 10 мкг/мл и карминомицин - 10 мкг/мл) без предобработки почвенных образцов. Перечисленные селективные приемы увеличивают долю актиномадур, выявляемых в почвенном актиномицетном комплексе, и значительно снижают долю стрептомицетов. Численность актиномадур, выделенных из чернозема без использования селективных приемов, не превышает 2×10^2 КОЕ/г почвы. При использовании селективных приемов для выделения актиномадур из чернозема количество актиномадур, выявляемых в почве, достигает 8×10^4 КОЕ/г почвы.

Для оценки доли актиномадур в почвенном актиномицетном комплексе следует использовать среду с пропионатом натрия с добавлением комплекса антибиотиков (рубомицин 1 мкг/мл или карминомицин 1,5 мкг/мл; налидиксовая кислота 1,5 мкг/мл; нистатин 50 мкг/мл) без предобработки посевного материала. Использование перечисленных селективных приемов

увеличивает долю актиномадур в актиномицетном комплексе при незначительном снижении доли стрептомицетов.

Дифференцированный учет актиномицетов проводили при микроскопировании колоний на чашках с питательной средой. Актиномицеты выделяли и культивировали на овсяном агаре. Для предварительной родовой идентификации использовали морфологические (наличие фрагментации и тип ветвления мицелия, характер расположения спор на воздушном и/или субстратном мицелии, их число, наличие спорангиев) (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994) и хемотаксономические признаки (присутствие LL- и мезо-изомеров диаминопимелиновой кислоты и дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток) (Lechevalier, 1992).

Видовая идентификация актиномадур и близких им актиномицетов проводилась по дифференцирующим таблицам *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994, с учетом описания видов рода *Actinodura*, данного в *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989, и в ключе для индентификации актиномадур (Preobrazhenskaya et al., 1978).

Динамика численности популяционной плотности почвенных актиномицетов исследована в ходе сукцессии, инициированной увлажнением воздушно сухих образцов чернозема обыкновенного и чернозема типичного до уровней влажности, соответствующих наименьшей влагоемкости (НВ) (-0,5 атм) и влаги завядания (ВЗ) (-3 атм) Дифференцированный учет актиномицетов проводился методом посева из почвы на 0 (сразу после увлажнения), 7, 14, 21, 28, 35 и 45 сутки опыта.

При изучении прорастания спор актиномицетов на предметные стекла наносили моноспоровую суспензию так, чтобы число спор в поле зрения составляло около 15-20 (1-й вариант) и около 45-60 (2-й вариант). В качестве показателя концентрации суспензии использовали количество спор в поле зрения. Стекла с нанесенной на них споровой суспензией высушивали при комнатной температуре и закладывали в чернозем, увлажненный до уровня влажности, соответствующего влаги завядания, на 0, 7 и 28-е сутки после увлажнения почвы и инкубировали в течение 3 суток. Контролем служили стекла со споровыми суспензиями, инкубированными во влажной камере. Учет количества проросших спор и длины проростков проводили под люминисцентным микроскопом МЛ-4 (*Методы почвенной микробиологии и биохимии*, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вертикально-ярусное распределение актиномадур в биогеоценозах основных почвенно-климатических зон. Распространение актиномадур в различных типах почв.

Численность представителей рода *Actinomadura* в исследованных биогеоценозах колебалась в пределах от десятков (минеральные горизонты почв) до сотен тысяч (моховые разрастания и горизонты подстилки) колониобразующих единиц (КОЕ)/г субстрата в зависимости от места субстрата в пространственно-сукцессионном ряду и типа биогеоценоза, что сопоставимо с численностью олигоспоровых и спорангиальных актиномицетов, но на 1-2 порядка уступает численности стрептомицетов и микромонопор. В растительном ярусе всех изученных экосистем актиномадур не обнаружены. В почвенном ярусе они не были выделены из элювиальных горизонтов

В исследованных лесных биогеоценозах максимальная численность актиномадур приурочена к напочвенному ярусу (моховым разрастаниям) и органогенным горизонтам почв (подстилке (слою F), торфяным горизонтам) (рис. 2(1), 3(1-4)). В разрастаниях зеленого мха количество представителей этого рода сопоставимо с численностью стрептомицетов и микромонопор (сотни тысяч КОЕ/г) и превышает численность других олигоспоровых актиномицетов на порядок.

Как показано на рис. 3(1-4), распределение численности актиномадур по профилям лесных почв отличается от распределения численности стрептомицетов: в случае актиномадур на кривой распределения численности наблюдаются ярко выраженные минимумы (в минеральных и элювиальных горизонтах почв) и максимумы (в F-слое подстилки, горизонте T1, горизонтах Ap и EB), в то время как стрептомицеты распределены по профилям почв достаточно равномерно (кривая распределения численности сглажена).

Максимальная доля актиномадур в актиномицетных комплексах лесных экосистем была отмечена в разрастаниях зеленого мха ельника-черничника на дерново-грунтово-глееватой почве (где доля актиномадур в актиномицетном комплексе сравнима с долей стрептомицетов, и в F-слое подстилки той же почвы (45% и 20% от всех выделенных родов соответственно) (рис. 4). Во всех остальных случаях доля актиномадур не превышала 10% от выделенных родов (максимальна в горизонтах T1 оторфованной подзолистой профильно-оглееной и Ap серой лесной почвы).

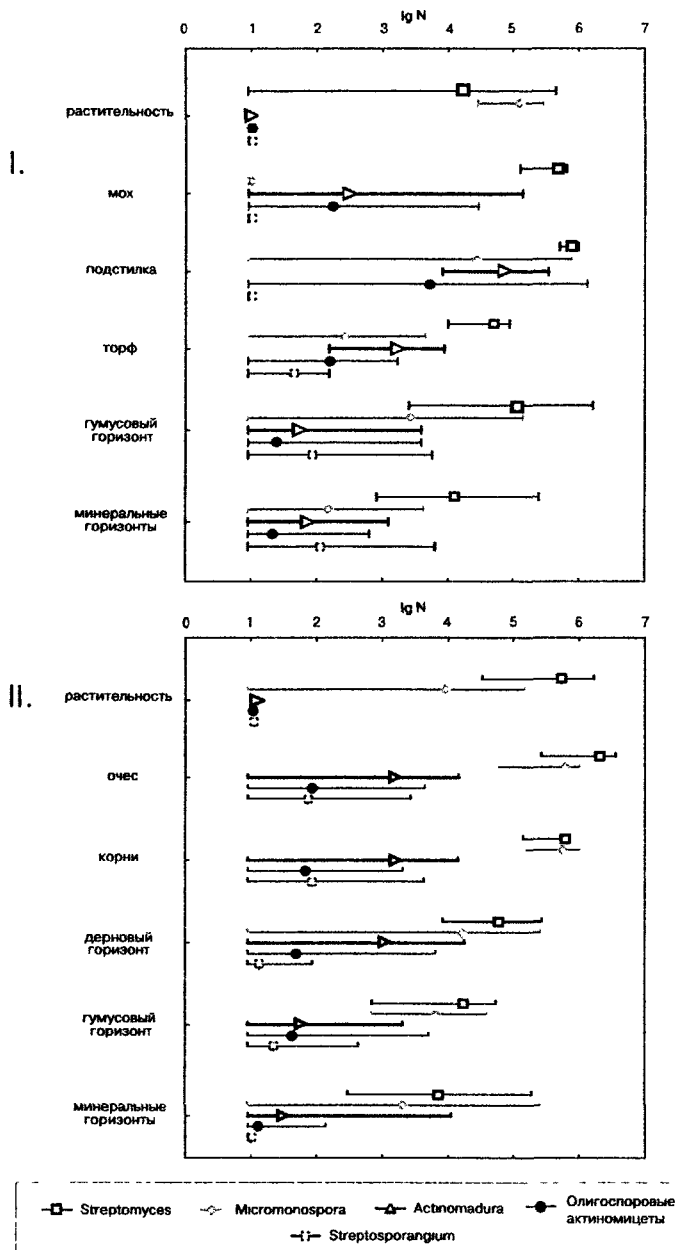


Рис. 2. Средние значения и пределы колебания численности (lg N) актиномицетов разных родов в ярусах лесных (I) и луговых (II) биогеоценозов

Численность актиномицетов рода *Actinomadura* в луговых биогеоценозах минимальна в минеральных и максимальна в дерновых горизонтах почв (рис. 2 (II), 3(5-6)).

Ход кривой распределения численности актиномадур по профилям аллювиальных почв повторяет ход кривой распределения численности стрептомицетов (рис. 3(5-6)): максимальная численность этих актиномицетов отмечена в верхних (органогенных) горизонтах почвенного профиля, она падает с увеличением глубины профиля.

Доля актиномадур в актиномицетном комплексе колеблется в пределах 1-3% в зависимости от яруса биогеоценоза, максимальна в гумусном горизонте (рис. 5(I)).

В разнотравно-типчачково-ковыльной степи на черноземе обыкновенном актиномадуры в максимальном количестве были выделены из гумусного горизонта почв. Характер кривой распределения численности актиномадур по профилю чернозема, в целом, совпадает с ходом кривой распределения численности стрептомицетов (рис. 3(7)). Кривые распределения имеют слабо выраженные максимумы в горизонтах Ad и AB; в нижней части профиля (горизонты B1 и B2ca) численность актиномадур резко падает, в то время как численность стрептомицетов практически не изменяется.

Доля актиномадур в актиномицетных комплексах различных ярусов не превышала 3% (рис. 5(II)).

В мятликово-полынной полупустыне на светлом сероземе они были обнаружены в максимальном количестве в гумусово-кальциевом горизонте почвы, где их доля в актиномицетном комплексе составила около 47% от выделенных родов и превысила долю стрептомицетов в 2 раза (рис. 5(III)). Ход кривой распределения численности актиномадур по профилю серозема резко отличается от хода кривой распределения численности стрептомицетов (рис. 3(8)): максимум численности актиномадур отмечен в A1ca-горизонте серозема, где наблюдается минимум численности стрептомицетов, в верхней и нижней частях профиля актиномадуры обнаруживаются в наименьшем количестве, в отличие от стрептомицетов.

Использование дисперсионного анализа (рис. 6) позволило статистически подтвердить приуроченность актиномадур к напочвенному ярусу (разрастания зеленого мха, очес, подстилка). Здесь их численность может быть достаточно велика, но величина доверительного интервала говорит о том, что их обнаружение является скорее нерегулярным событием. Актиномадуры могут быть обнаружены в дерновом горизонте и в ризосфере, а также в торфе, в гумусовых и минеральных горизонтах почв, где регулярность их обнаружения выше, но численность ниже. Таким образом, пока-

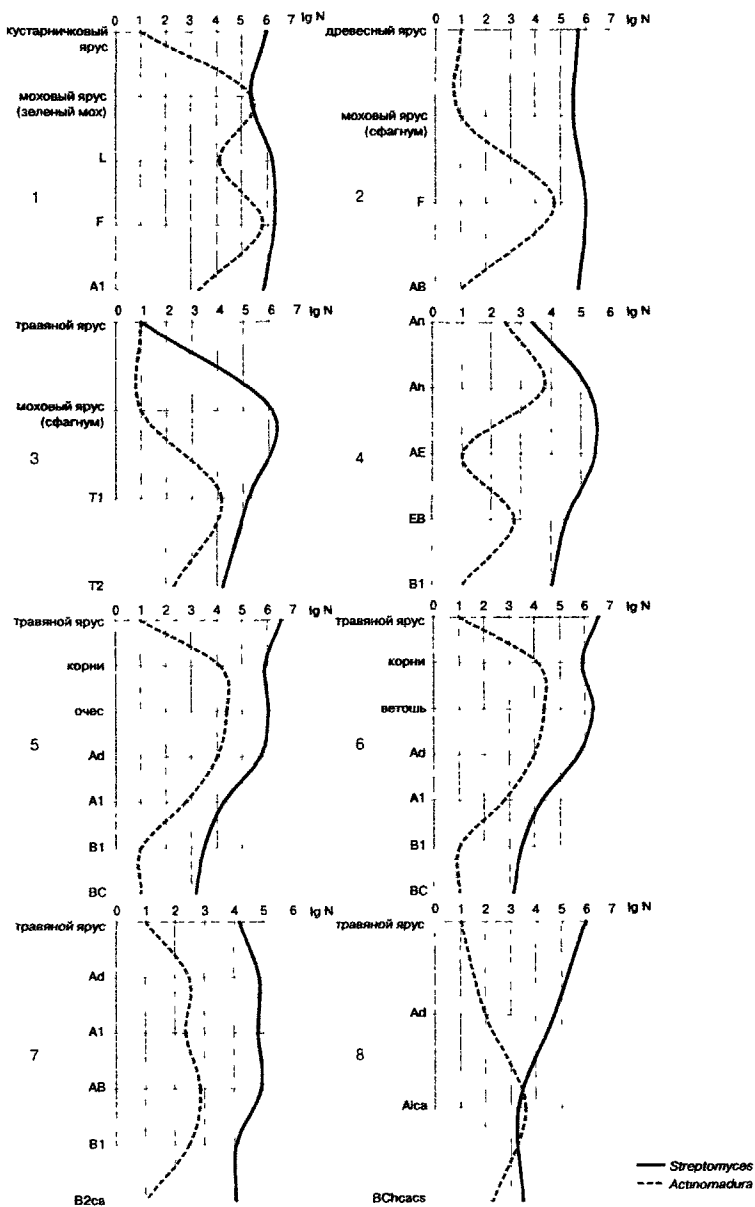


Рис. 3. Распределение численности актиномадур и стрептомицетов по профилю почв 1 - дерново-грунтово-глееватой; 2 - бурой лесной кислой грубогумусной, 3 - оторфованной подзолистой профильно-оглеенной, 4 - серой лесной; 5-6 - аллювиально-луговой (на высокой пойме и низкой пойме), 7 - черноземе обыкновенном, 8 - сероземе светлом

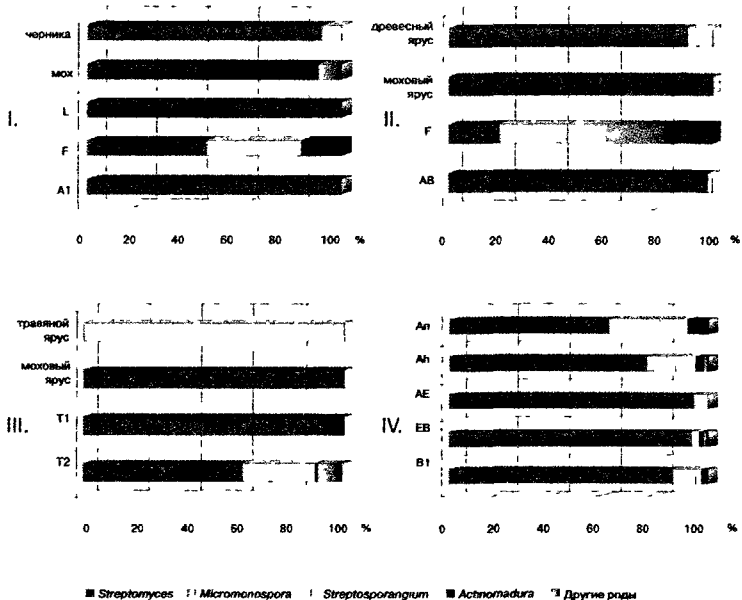


Рис. 4. Соотношение родов (%) в актиномицетных комплексах лесных биогеоценозов на дерново-грунтово-глееватой почве (I), на бурой лесной кислой грубогумусной почве (II), на оторфованной подзолистой профилно-оглеенной почве (III), на серой лесной почве (IV)

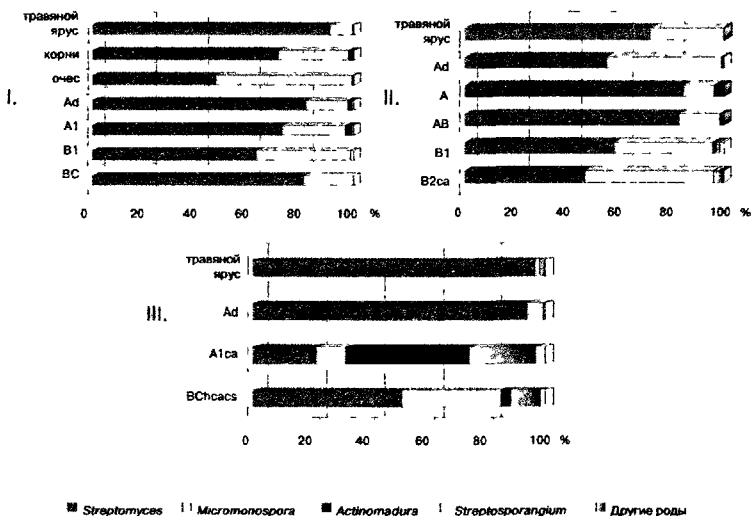


Рис. 5. Соотношение родов (%) в актиномицетных комплексах лугового биогеоценоза на аллювиально-луговой почве (I), степного на черноземе обыкновенном (II) и полулугового на черноземе (III)

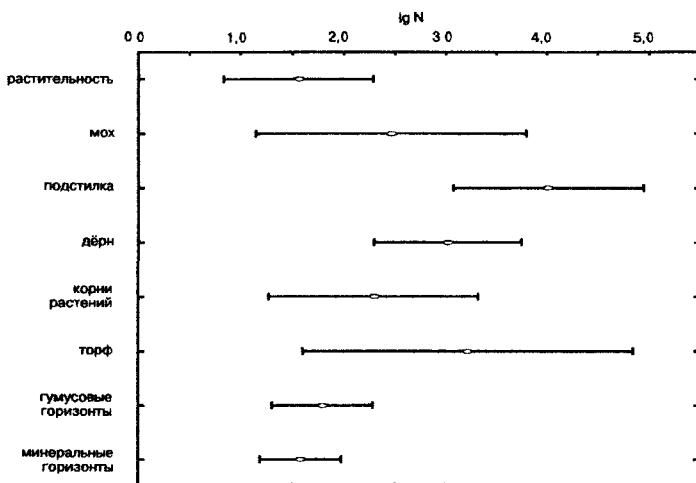


Рис. 6. Распределение численности актиномицетов по ярусам биогеоценозов

зано, что актиномицеты приурочены к напочвенному и почвенному ярусам и среди них не обнаружены представители эпифитной микрофлоры.

В распределении численности актиномицетов в зональном ряду почв (рис. 7) прослеживаются следующие закономерности:

- наибольшие средние показатели популяционной плотности актиномицетов (тысячи КОЕ/г) отмечены в дерново-грунтово-глеевой, оторфованной подзолистой профильно-оглеенной почвах и сероземе светлом; минимальные средние показатели популяционной плотности актиномицетов (десятки КОЕ/г) были в бурой лесной кислой грубогумусной и желтой ферралитной почвах;
- наибольшие максимальные значения популяционной плотности актиномицетов отмечены в дерново-грунтово-глеевой, оторфованной подзолистой профильно-оглеенной, аллювиально-луговой и серой лесной почвах, а также в сероземе светлом (до десятков тысяч КОЕ/г);
- наибольшие минимальные значения популяционной плотности актиномицетов отмечены в дерново-грунтово-глеевой, оторфованной подзолистой профильно-оглеенной почвах и сероземе светлом,
- максимальные пределы колебаний численности актиномицетов наблюдаются в аллювиально-луговой и серой лесной почвах (в пределах трех порядков КОЕ/г); минимальные - в бурой лесной кислой грубогумусной, красной и желтой ферралитной почвах (в пределах одного порядка КОЕ/г).

Таким образом, максимальная популяционная плотность актиномицетов при небольших пределах колебаний численности этих актиномицетов от-

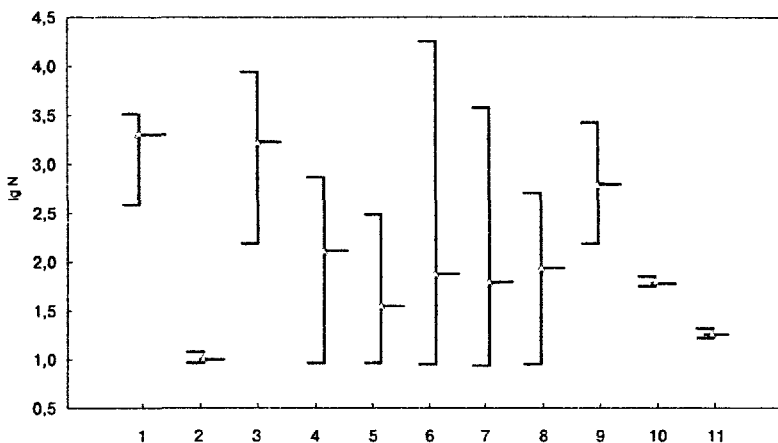


Рис. 7. Средние значения и колебания численности актиномадур в почвах разных типов 1 - дерново-грунтово-глееватая; 2 - бурая лесная кислая грубогумусная; 3 - оторфованная подзолистая профильно-оглееная; 4 - дерново-луговая; 5 - дерново-подзолистая, 6 - аллювиально-луговая; 7 - серая лесная; 8 - чернозем обыкновенный; 9 - серозем светлый; 10 - красная ферралитная; 11 - желтая ферралитная

мечена в дерново-грунтово-глеевой, оторфованной подзолистой профильно-оглееной почвах и сероземе светлом.

Значительные размеры пределов колебаний популяционной плотности актиномадур в почвах и небольшие средние значения численности этих актиномицетов свидетельствуют о том, что актиномадур встречаются в почвенном профиле, как правило, в малом количестве и распределены по нему очень неравномерно.

В распределении актиномадур по профилю почв и по ярусам биогеоценозов существуют следующие особенности:

1. Распределение актиномадур по ярусам биогеоценозов в целом подчиняется следующей закономерности - максимальная численность отмечена в наземном ярусе (разрастания мха) и органогенных горизонтах почв (F-слой подстилки, дерновые и гумусовые горизонты); минимальная - на поверхности высших растений и в минеральной толще почвенного профиля (BC, AE, E горизонты почв). Это можно объяснить требовательностью актиномадур к источникам питания.
2. Распределение актиномадур по почвенному профилю зависит от перераспределения по профилю органических и минеральных веществ, так как в почвах с дифференцированным профилем в горизонтах аккумуляции питательных веществ отмечены ярко выраженные максимумы в ходе кривой распределения численности актиномадур, а в гори-

- зонтах, бедных питательными веществами, (элювиальные и нижние минеральные горизонты) были отмечены минимумы численности.
3. Показано, что актиномадуры являются минорным компонентом комплекса актиномицетов исследованных биогеоценозов (доля не превышает 9% от общего числа актиномицетов), исключение составляет гумусово-кальциевый горизонт серозема светлого (47%).
 4. Численность актиномадур и близких им родов уступает на 1-2 порядка численности стрептомицетов и микромоноспор.

Распределение рода Actinomadura по элементам рельефа; сезонная динамика их численности

Исследование сезонной динамики распределения численности актиномадур и их приуроченности к различным элементам рельефа проводили на примере пойменных ландшафтов р. Протвы: высокая пойма-низкая пойма-прирусловой вал-речной ил (рис. 8).

Актиномадуры были приурочены к органогенным горизонтам почв (дерновому и гумусовому) вне зависимости от элементов рельефа, на которых находились почвенные разрезы.

В сезонном распределении численности актиномадур по профилю почв наблюдалась следующая закономерность: в почве на высокой пойме летом максимальная численность актиномадур была отмечена в зоне корней, осенью и зимой - в дерновом горизонте; в почве на низкой пойме летом и зимой численность актиномадур была максимальной в дерновом горизонте, а осенью в горизонте очеса.

Динамика численности актиномадур в ходе микробной сукцессии в почве

Наблюдение за динамикой популяций в ходе микробной сукцессии, инициированной увлажнением чернозема обыкновенного до уровней влажности -0,5 атм и -3 атм, соответствующих наименьшей влагоемкости (НВ) и влаги завядания (ВЗ), показало, что динамика популяций актиномадур в ходе сукцессий отличается от динамики популяций других родов (рис. 9), что свидетельствует об особом экологическом положении представителей рода *Actinomadura* в сообществе почвенных актиномицетов. Актиномадуры были на 4-м месте по численности после стрептомицетов, микромоноспор и стрептоспорангиев.

Максимальные показатели популяционной плотности актиномадур отмечены на 7 и 28-е сут. сукцессии - при увлажнение почвы до уровня ВЗ, и на 7 сутки - в случае увлажнения до НВ. Промежуточные этапы сукцессии характеризовались спадом популяционной плотности актиномадур. Таким

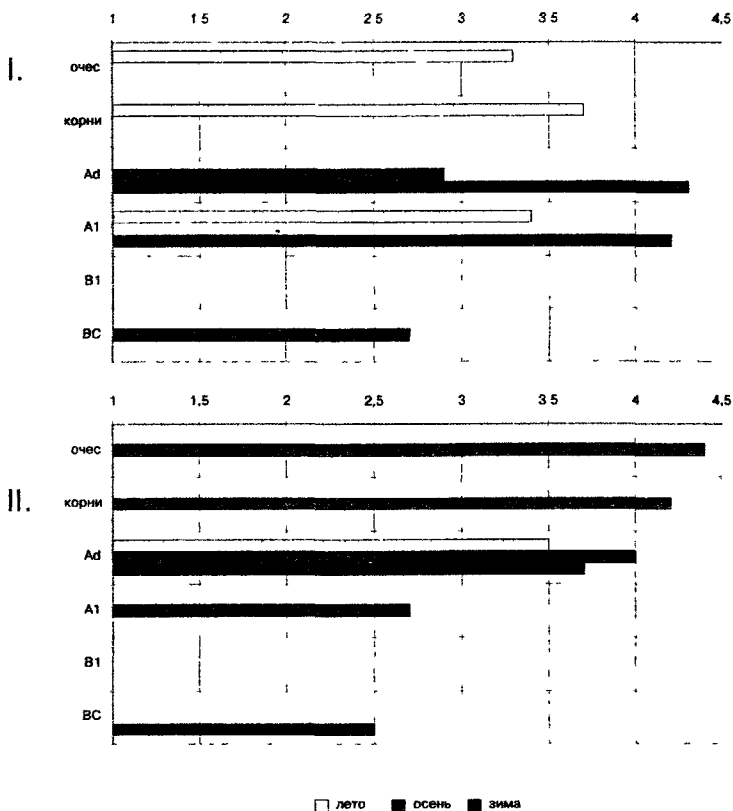


Рис. 8. Сезонные колебания популяционной плотности актиномадур в различных ярусах луговых биогеоценозов на высокой (I) и низкой (II) поймах

образом, показано, что наиболее благоприятны для выделения из почвы представителей рода *Actinomadura* ранние и поздние сроки сукцессии.

На основании данных о динамике популяционной плотности актиномицетных родов в ходе сукцессии, инициированной увлажнением чернозема, рассчитано попарное перекрытие экологических ниш пяти родов актиномицетов - *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora* и *Streptosporangium* (табл. 2). Наиболее близкими оказались экониши пары *Streptomyces-Micromonospora*, перекрытие экониш пар *Streptomyces-Actinomadura*, *Micromonospora-Actinomadura* и *Streptosporangium-Actinomadura* было практически одинаково (0.54, 0.52 и 0.44), в то время как перекрытие экониш пары актиномадур-сахарополиспоры оказалось невелико (0,11).

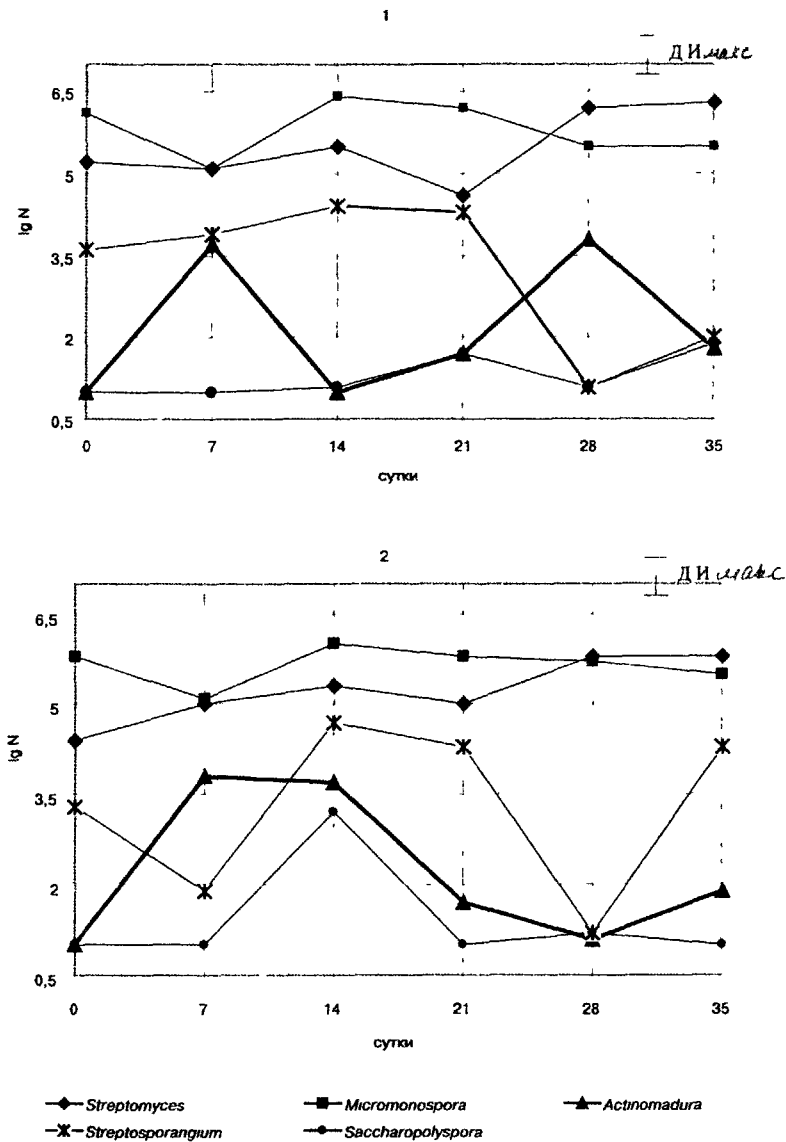


Рис. 9. Динамика популяционной плотности актиномицетов разных родов в ходе сукцессии, инициированной увлажнением чернозема обыкновенного до уровней влажности, соответствующих влаге завядания (1) и наименьшей влагоемкости (2)

Степень перекрытия экологических ниш актиномицетов в черноземе

	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Streptosporangium</i>	<i>Saccharopolyspora</i>
<i>Streptomyces</i>		0,690	0,540	0,490	0,218
<i>Micromonospora</i>	0,690		0,517	0,525	0,154
<i>Actinomadura</i>	0,540	0,517		0,435	0,105
<i>Streptosporangium</i>	0,490	0,525	0,435		0,187
<i>Saccharopolyspora</i>	0,218	0,154	0,105	0,187	

Статистическая обработка данных и анализ степеней попарного перекрытия экологических ниш еще раз подтверждают, что актиномадуры занимают свое уникальное место в сукцессии актиномицетов.

Кластерный анализ (рис. 10), выполненный на основе матрицы данных о частоте встречаемости актиномицетов разных родов в различных субстра-

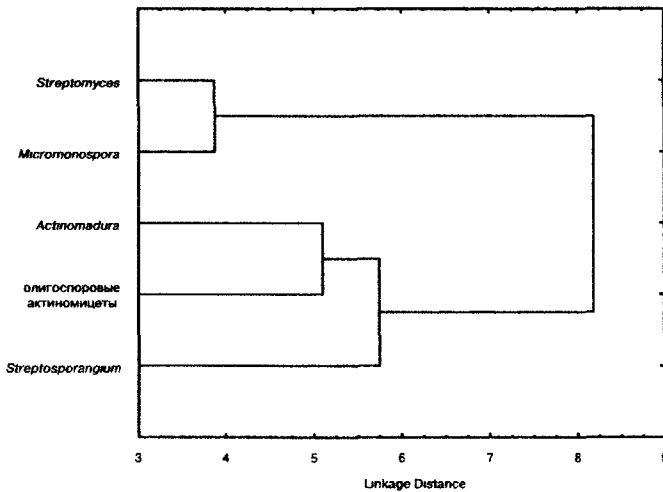


Рис. 10. Кластерный анализ данных о частоте обнаружения актиномицетов разных родов в различных субстратах

тах, показал, что актиномадуры близки редким родам актиномицетов. Микромоноспоры и стрептомицеты ближе друг другу, чем к группе редких родов.

Структура популяций актиномадур в почве

При исследовании методом люминисцентной микроскопии прорастания спор актиномадур, зафиксированных на стеклах и интродуцированных в

почву, были получены данные, которые затем были сравнены с показателями, полученными для прорастания спор стрептомицетов.

Исследовались зависимости процесса прорастания спор от совместного действия 2-х факторов - исходной популяционной плотности спор актиномицетов и этапа микробной сукцессии, на котором споры были интродуцированы в почву. Показано, что на прорастание спор актиномадур этап сукцессии, на котором споры были интродуцированы в почву, влиял в меньшей степени (на 28-е сут. проросло в 1,3 раза больше спор, чем на 7-е сут.), чем концентрация споровой суспензии (в более концентрированных суспензиях проросло в 2 раза меньше спор, чем в разбавленных). Стрептомицетные споры активнее, чем споры актиномадур, реагировали как на концентрацию споровой суспензии, так и на этап сукцессии, на котором они были интродуцированы в почву, - в более концентрированных суспензиях спор проросло в 5 раз меньше, чем в разбавленных суспензиях, при интродукции в почву на 7-е сут. и в 3 раза меньше - при интродукции на 28-е сут.

Для наглядности информация, полученная после статистического анализа совокупности данных представлена графически (рис. 11(I)). Зависимость между тремя переменными в диапазоне исходного обилия от 10 до 60 клеток в поле зрения имеет прямолинейный характер и может быть выражена множественными уравнениями плоскости регрессии вида $z = ax + by + c$:

$$\text{для } Actinoadura \text{ coerulea} \quad z = 0,567x + 0,031y + 2,160;$$

$$\text{для } Streptomyces \text{ xanthochromogenus} \quad z = 1,042x - 0,084y - 1,160,$$

где z - прорастание спор (%); x - среднее расстояние между спорами (мкм); y - стадия сукцессии (сутки).

Длина проростков мицелия актиномадур составила в среднем 137 мкм, а стрептомицетов - 154 мкм (рис. 11 (II)). Статистическая обработка данных показала, что разница в длине проростков мицелия представителей этих двух родов не является статистически значимой. Встречаемость полей зрения с развитым актиномицетным мицелием, развившимся из спор, зафиксированных на стеклах, составила 60% - на стеклах со стрептомицетными спорами, и 30% - на стеклах со спорами актиномадур (рис. 11(III)).

При равных условиях споры актиномадур прорастают в почве в большем числе, чем споры стрептомицетов, в то время как развитие проростков в мицелий у стрептомицетов происходит быстрее.

В результате проведенной работы была создана коллекция из 40 штаммов, отнесенных к роду *Actinoadura*, и предварительно идентифицированы до видов: *A. atramentaria* (CH7, S1, S6), *A. citrea* (CH2), *A. coerulea* (EP4, EP23), *A. cremea* (CH110), *A. kijaniata* (CHA10, CHA13), *A. macra*

I.

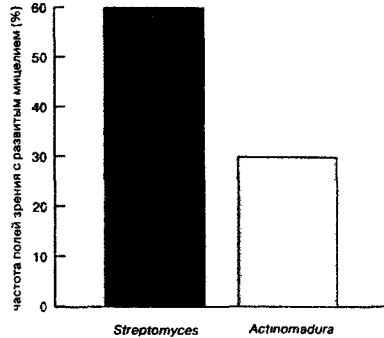
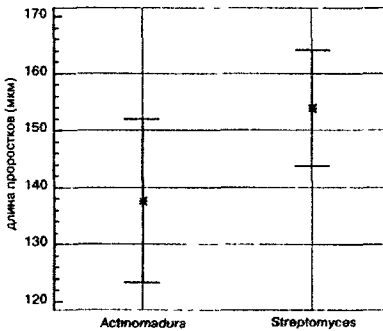
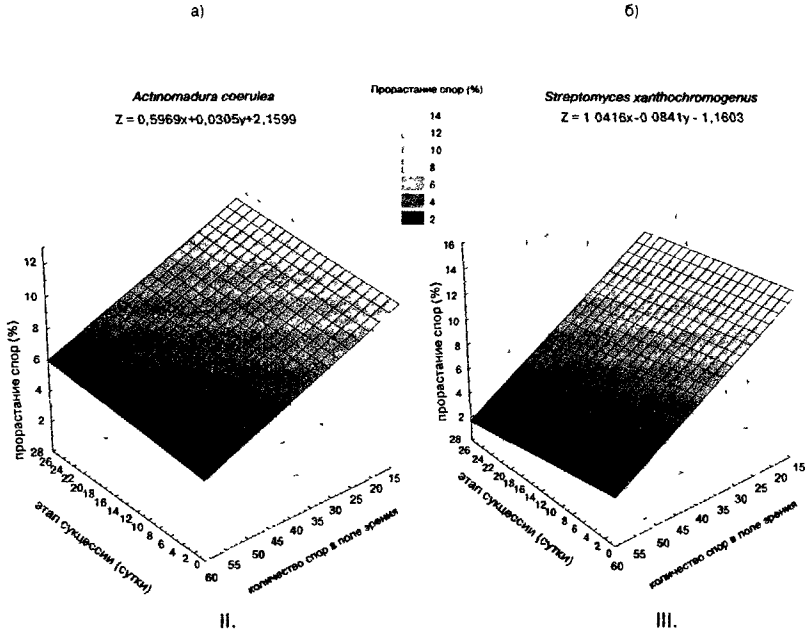


Рис. 11. Графическое представление данных, полученных при изучении прорастания спор актиномадур и стрептомицетов методом люминисцентной микроскопии I - зависимость относительного содержания проросших спор от концентрации спор и стадии сукцессии для *Actinomadura coerulea* (а) и *Streptomyces xanthochromogenus* (б). II - длина проростков мицелия у актиномадур и стрептомицетов; III - частота встречаемости микрозон с развитым мицелием в препаратах актиномадур и стрептомицетов

(CH17, CH20, CH21, CH41), *A. spadix* (CH212), *A. verrucosospora* (S3), *A. vinacea* (EP2, CH04, CH24, CH25, CH29, CH40, CH42, CH43, CH46, CH48), *A. viridis* (CH283), *A. yumaensis* (CH23), *A. glomerata* (*Actinocorallia glomerata*)(F10), *A. libanotica* (*Actinocorallia libanotica*)(EP14), *A. fastidiosa* (*Nonomuraea fastidiosa*) (CH23, CH19), *A. ferruginea* (*N. ferruginea*) (EP1), *A. pusilla* (*N. pusilla*) (SA1, SA7, CHAd3, CHAd36), *A. spiralis* (*N. spiralis*) (CH14, CH16, S7), *A. turkmeniaca* (*N. turkmeniaca*) (S8).

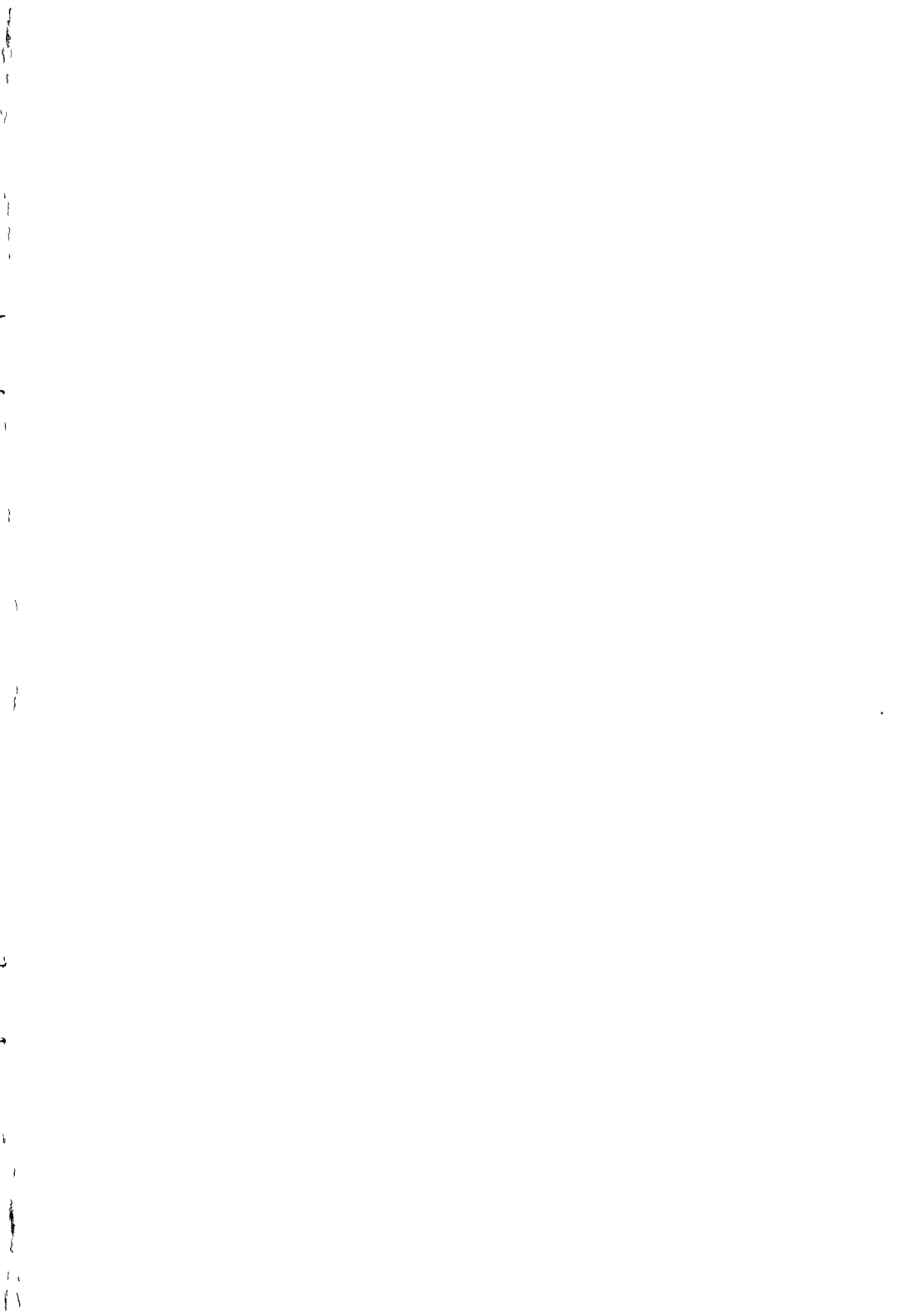
ВЫВОДЫ

1. Разработаны селективные приемы для выделения из почв и сопряженных с ними растительных субстратов и для экологической оценки актиномицетов рода *Actinomadura*, заключающиеся в использовании тепловой предобработки образцов, посева на селективные среды с добавлением комплекса антибиотиков и длительной инкубации посевов. Эти приемы увеличивают количество выделяемых актиномадур в 100-1000 раз.
2. Впервые показано, что актиномадуры широко распространены во всех исследованных экосистемах. Их численность колеблется от десятков КОЕ/г до сотен тысяч КОЕ/г в зависимости от положения субстрата в пространственно-сукцессионном ряду и типа биогеоценоза. Численность актиномадур в актиномицетных комплексах сопоставима с численностью олигоспоровых и спорангиальных актиномицетов и незначительно уступает численности стрептомицетов и микромонопор. Актиномадуры - минорный компонент актиномицетных комплексов.
3. Установлено, что численность представителей рода *Actinomadura* максимальна в дерново-грунтово-глеевой, оторфованной подзолистой профильно-оглеевой почвах и сероземе светлом.
4. Присутствие актиномадур в наземных экосистемах связано с обогащением субстратов растительными остатками и биологически активными веществами. В лесной зоне - это слой подстилки и торфяные горизонты, в луговых биогеоценозах - горизонт Ad, в степном и полупустынном биогеоценозах - верхние гумусированные почвенные горизонты. В элювиальных горизонтах почв и на поверхности высших растений актиномадуры не обнаружены.
5. Использование сукцессионного анализа дало возможность установить, что наиболее благоприятные условия для развития актиномадур складываются на ранних стадиях сукцессии при разных уровнях увлажнения почвы. Экологические ниши актиномадур наиболее близки эконишам стрептомицетов, микромонопор, стрептоспорангиев, наиболее разобщены с эконишей сахарополиспор.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михайлова Н.В., Захарова О.С. и Зенова Г.М. Олигоспоровые актиномицеты в почвах // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 1998. №6. с. 13-16.
2. Zenova G.M., Likhacheva A.A., Michaylova N.V., Maslova E.M. & Zakharova O.S. Dynamics of populations rare actinomycetes in soil // IXth Int. Congr. Bact. Appl. Microb. Sydney, Australia. Abstract book. 1999. p. 77.
3. Захарова О.С. Актиномицеты рода *Actinomadura* в наземных биогеоценозах // VI Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов". Тез. докл. М.. 1999. с. 44-45.
4. Зенова Г.М., Михайлова Н.В., Захарова О.С., Звягинцев Д.Г. Вертикально-ярусная стратификация олигоспоровых актиномицетов в разных типах биогеоценозов // Почвоведение. 2000. №2. с. 231-234
5. Захарова О.С. Динамика популяций рода *Actinomadura* в ходе микробной сукцессии в почве // VII Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов". Тез. докл. М.. 2000. с. 25.
6. Захарова О.С., Сильянова О.Б. Динамика популяций родов *Micromonospora* и *Actinomadura* в ходе микробной сукцессии в почве // Тезисы докладов III съезда Докучаевского общества почвоведов. Книга 2. М.. 2000. с. 18-19.
7. Зенова Г.М., Захарова О.С., Михайлова Н.В. и Звягинцев Д.Г. Экологический статус актиномицетов рода *Actinomadura* // Почвоведение. 2001. №4. с. 455-460.
8. Захарова О.С. Методы выделения актиномадур из почвы в целях исследования экологии рода // VIII Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов". Тез. докл. М.. 2001. с. 47.
9. Захарова О.С. Актиномицеты рода *Actinomadura* в аллювиально-луговой почве // Биология - наука 21-о века. 5-я Пушинская конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино. 2001. с. 230-231.
10. Zenova, G.M., Likhacheva, A.A., Shulga-Mikhaylova, N.V., Zakharova, O.S. Novel methods for selective isolation of rare actinomycetes from soil // XIth International Symposium on Biology of Actinomycetes. Vancouver. Canada. 2001. p. 80.
11. Zakharova, O.S., Zenova, G.M. Dynamics of actinomadurae populations in soil // XIth International Symposium on Biology of Actinomycetes. Vancouver. Canada. 2001. p. 62.

12. Захарова О.С., Смирнова М.В., Лихачева А.А. Экология актиномицетов: методические приемы выделения редких родов // Материалы международной конференции: "Экология и биогеохимическая деятельность микроорганизмов". Одесса. Сентябрь 2001. с.
13. Захарова О.С. Динамика популяций актиномадур в ходе микробной сукцессии в черноземе // Биология - наука 21-о века. 6-я Пушкинская конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино. 2002. с. 215.
14. Зенова Г.М., Захарова О.С., Шульга-Михайлова Н.В., Звягинцев Д.Г. Актиномицетные комплексы пойменных ландшафтов реки Протвы // Почвоведение. 2002. № 11. с. 1346-1354.
15. Захарова О.С. Актиномицеты рода *Actinomadura* в почвах лесных экосистем // Биogeография почв. Международная конференция. Тез. докл.. Сыктывкар. 2002. с. 99-100.
16. Захарова О.С., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Селективные приемы выделения из почвы актиномицетов рода *Actinomadura* // Микробиология. 2003. т. 72. № 1. с. 126-130.
17. Захарова О.С. Прорастание спор актиномицетов родов *Actinomadura* и *Streptomyces* в почве // X-я Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов". Тез. докл. М.. 2003. с. 53.
18. Захарова О.С. Прорастание спор актиномицетов рода *Actinomadura* в почве // Биология - наука 21-о века. 7-я Пушкинская конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пушино. 2003. с. 221.



2003-A

18302

18302

Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г. Москва, Ленинские горы, д. 1
Главное здание МГУ, к. 102
Тираж 100 экз. Заказ №94