

*На правах рукописи*

**ГРАЧЕВА Татьяна Александровна**

**АКТИНОМИЦЕТЫ РОДА *MICROMONOSPORA*  
В НАЗЕМНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ**

Специальность 03.00.07 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА 2004 г.

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

- Научный руководитель:** доктор биологических наук  
профессор Г.М. Зенова
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
профессор А.Х. Тамбиев  
кандидат биологических наук  
В.К. Орлеанский
- Ведущее учреждение:** ГУ НИИ экологии человека и  
гигиены окружающей среды  
им. А.Н. Сысина РАМН

Защита диссертации состоится « » \_\_\_\_\_ 2004 г. в 15 час. 30 мин. в аудитории М - 2 на заседании Диссертационного совета К.501.001.05 при МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке факультета почвоведения МГУ.

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2004г.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного совета. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять 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

### ***Актуальность темы.***

Родовое название "*Micromonospora*" было впервые предложено Эрсковым в 1923 г. (Oerskov, 1923) для мицелиальных бактерий, образующих колонии с одиночными спорами на субстратном мицелии, со стерильным воздушным мицелием и без воздушного мицелия. Впоследствии микромоноспоры были выделены из почв Австралии в 1932 г. (Jensen, 1932), позднее Криссом из почв России (1939), однако, главной средой обитания микромоноспор до сих пор считались водные экосистемы - пресноводные и морские (Goodfellow, Cross, 1984). Несмотря на то, что прошло более полувека со времени открытия рода *Micromonospora*, закономерности распространения и локализации микромоноспор в наземных экосистемах, остаются мало изученными. В литературе практически нет сведений о распространении этих организмов по вертикальной структуре биогеоценозов, между тем, биоценологический подход требует изучения микробных сообществ не только в почве, но и в других элементах биогеоценозов.

Интерес к микромоноспорам обусловлен ценностью представителей этого рода для биотехнологических процессов. Среди этих актиномицетов после 1970 г. выявлены активные продуценты высокоэффективных антибиотиков, широко применяемых в медицине, в первую очередь, аминогликозидного и макролидного ряда, протеолитических ферментов, ингибиторов р-лактамаз типа изуменолоидов и других физиологически активных веществ. В связи с этим своевременным является проведение экологических исследований микромоноспоровых актиномицетов. Выявление закономерностей распространения актиномицетов рода *Micromonospora* пополнит наши знания о биоразнообразии микробного мира.

- ***Целью работы*** явился анализ основных экологических показателей актиномицетов рода *Micromonospora*: распределения в биогеоценозах основных почвенно-климатических зон, видового состава и популяционной структуры (споры-мицелий), и экологической стратегии.

- ***Задачи исследования:***



1. Разработка эффективных селективных методов для более полной изоляции микромоноспор из природных субстратов (почвы и растительные субстраты).

2. Определение закономерностей распределения численности микромоноспор по вертикально-ярусной структуре биогеоценозов основных почвенно-климатических зон.

3. Изучение видового состава актиномицетов рода *Micromonospora* в основных типах почв.

4. Выяснение популяционной структуры (споры-мицелий) микромоноспоровых актиномицетов в почве.

5. Использование сукцессионного анализа для выявления места микромоноспор в почвенном актиномицетном комплексе.

6. Создание коллекции культур *рода Micromonospora*.

- *Научная новизна.*

Разработаны селективные приемы для наиболее полной изоляции актиномицетов рода *Micromonospora* из почвы и растительных субстратов, заключающиеся в термической предобработке образцов, использовании селективной среды с комплексом антибиотиков и длительной инкубации посевов.

Впервые установлено, что микромоноспоры, наряду со стрептомицетами, не являются "редкими" (редко встречающимися) формами в почвенных актиномицетных комплексах. Показано, что основным местообитанием микромоноспор являются субстраты, обогащенные растительными остатками (подстилка, войлок, дернина). Впервые для микромоноспор проведен анализ популяционной структуры на основе данных прямой микроскопии и стохастической марковской модели. Установлено, что в равновесных условиях в популяционной структуре 93% колониеобразующих единиц представлено спорами, а 7% - мицелием.

- *Практическая значимость.*

В результате проделанной работы подобраны методические подходы для выявления и количественного учета микромоноспор в почве и раститель-

ных субстратах. Использован метод посева из разведений почвенных и растительных суспензий на селективные питательные среды с предобработкой образцов. Впервые для выделения микромонопор из почвы использован газохроматографический хромато-масс-спектрометрический метод, основанный на анализе состава жирных кислот суммарной биомассы некоторых представителей рода *Micromonospora*. Установленные закономерности распределения микромонопор по вертикально-ярусной структуре заповедных наземных биогеоценозов пополняют наши знания о микробном разнообразии и могут быть использованы в качестве эталонных при проведении работ по биологическому мониторингу, а также служить для оценки природных ресурсов в целях биотехнологии.

Из почв различных типов выделена коллекция микромонопор, которая может быть использована для поиска среди них продуцентов биологически активных веществ..

- *Апробация работы.* Основные положения работы доложены на международных конференциях "Ломоносов-96" (Москва, 1996), "Ломоносов-2004" (Москва, 2004), на заседании кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ.

- *Публикации.* Материалы диссертации изложены в 10 печатных работах.

- *Объем работы.* Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение и выводы. Материалы диссертации изложены на ... страницах машинописного текста. Список литературы включает ... источников, из них ... - зарубежные.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой биологии почв проф. д.б.н. академику РАЕН Д.Г. Звягинцеву за постоянное внимание к работе. Автор сердечно благодарит д.б.н. П.А. Кожевина, д.б.н. сотрудника ВНИИ биологического приборостроения Г.А.Осипова, проф. д.б.н. И.Ю. Чернова за ценные консультации и помощь в работе. Автор выражает глубочайшую признательность к.б.н. А.А. Лихачевой и всему кол-

лективу кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова за сотрудничество и поддержку.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### *Объекты исследования*

Объектами исследования явились лесные, луговые биогеоценозы в гумидной, степные и пустынные биогеоценозы в аридных зонах на территории России и СНГ (табл. 1). Образцы согласно биоценологическому подходу отбирались по элементам вертикально-ярусной структуры биомов: в лесных - из наземного яруса (филлоплана растений, образцы листьев деревьев, кустарников, трав, типичных для каждого биогеоценоза); из наземного яруса (моховой покров, слои подстилки); из собственно почвенного яруса (минеральные горизонты почвы). В степных биогеоценозах анализировали образцы степных растений (типчак, ковыль), степного войлока, горизонтов почвы. В пустынных биомах отбирали образцы различных частей доминирующих видов растений (зеленые, сухие и опавшие листья и древесные части), корни с глубины 10 - 20 см, а также образцы почв.

### *Методы исследования*

Проводили сравнительные исследования эффективности селективных приемов для наиболее полного выявления микромонопор: влияние состава питательных сред и различных факторов обработки субстрата на численность микромонопор. В этих целях в качестве агаризованных питательных сред использовали следующие: среду с пропионатом натрия, минеральный агар № 1, нитритный агар, агар Чапека, среду с гороховой мукой.

Из числа испытанных сред оптимальной для роста и развития большинства микромонопор оказалась среда с пропионатом натрия. При ее использовании микромонопоры выделялись из всех исследуемых субстратов (подстилка, почва), колонии, окрашенные в оранжевый, красный, черный цвета были хорошо видны невооруженным глазом. Установлено, что каждый используемый прием тепловой предобработки субстрата (прогревание 1ч при

## Характеристика объектов исследования.

Экосистемы	Название почвы, растительность	Район взятия образцов
Лесные	серая лесная (липовый лес)	Тульская обл., Щекинский р-н
	оторфованная подзолистая профильно-оглеенная (ельник-черничник)	Тверская обл., Центрально-лесной государственный биосферный заповедник (ЦЛГБЗ)
	бурая лесная кислая грубогумусовая (ельник сложный)	там же
	торфянисто-подзолистая профильно-оглеенная (ельник-черничник)	Рязанская обл., Окский государственный биосферный заповедник
	дерново-подзолистая (сосняк-зеленомошник)	там же
	подзолистая (сосняк-беломошник)	там же
	аллювиальная дерново-луговая (пойменная дубрава)	там же
дерново-подзолистая (березняк)	там же	
Луговые	аллювиальная луговая (пойменный луг)	там же
Степные	чернозем обыкновенный (ковыльная степь)	Воронежская обл., Галловский р-н
	чернозем типичный (разнотравно-злаковая степь)	Курская обл., Курский р-н
	каптановая остаточносолонцеватая (типчакowo-полянная степь)	Ростовская обл., Пролетарский р-н
Пустынные	серо-бурая пустынная легкосуглинистая (солянково-полянная глинистая пустыня)	Узбекистан, Бухарская обл., Кызылкумская пустынная станция Института ботаники АН Узбекистана
	серо-бурая пустынная (джузгунник осоковый)	Узбекистан, Бухарская обл., Караганский р-н
	пустынная песчаная (смешанный саксаульник)	Туркмения, Репетекский государственный биосферный заповедник
	литосоли (каменистые склоны низкогорий), (кустарниковый покров из <i>Zygophyllum dumosum</i> )	Израиль, пустыня Негев
	супесчаные аллювиальные (вади-долины, формирующиеся вдоль русел временных водотоков)	там же

100° С, прогревание суспензии почвы и подстилки 10 мин при 70° С) повышало долю микромонопор в актиномицетном комплексе по сравнению с контролем (посев без предобработки). Исходя из полученных данных, для выделения моноспоровых актиномицетов пользовались комбинированным методом, состоящим из следующих селективных приемов: прогревание почвенных и растительных суспензий перед посевом 10 мин при t 70° С; использование среды с пропионатом натрия; добавление в питательные среды антибиотиков - налидиксовой кислоты (1,5 мкг/мл), рубомицина (1 мкг/мл), нистатина (50 мкг/мл) для ограничения роста немителиальных бактерий и грибов; длительные сроки инкубирования посевов (3-4 недели) при 28° С. Численность и доленое участие в комплексе актиномицетов микромонопор сопоставляли с распределением стрептомицетов в биогеоценозах, основываясь на том, что используемый метод значительно не уменьшал количество выявляемых стрептомицетов.

Для определения принадлежности к родам *Streptomyces*, *Micromonospora* использовали морфологические характеристики (наличие воздушного и/или субстратного мицелия, фрагментация и ветвление мицелия, присутствие и количество спор на воздушном и/или субстратном мицелии) и хемотаксономические признаки (присутствие L - или мезо-изомера диаминопимелиновой кислоты и дифференцирующих Сахаров в гидролизатах целых клеток).

Культуры микромонопор и стрептомицетов выделяли и поддерживали на минеральной среде Гаузе 1. Разделение на цветовые группы видов микромонопор проводили с помощью практического ключа Бибиковой, Иваницкой (1989) на основе культурально-морфологических признаков.

Кроме традиционного метода посева на плотные питательные среды для экспрессного обнаружения микромонопор в почве, был использован газохроматографический хромато-масс-спектрометрический метод, основанный на анализе жирных кислот микроорганизмов. С помощью ГХ-ХМС метода изучен состав жирных кислот биомассы трех культур микромонопор. При этом обнаружен ряд соединений, включающий изопентадекановую, изо-



гексадекановую и туберкулостеариновую кислоты. Соотношение этих жирных кислот в пределах рода *Micromonospora* уникально и в подобном составе и пропорции практически не встречаются у других микроорганизмов, что дало возможность дифференцированно выявить представителей этого рода в субстратах. Эти результаты были использованы для обнаружения микромонопор в торфяной почве. Наши данные свидетельствуют о том, что в микробной экологии данный метод может быть применен для экспресс-поиска представителей рода *Micromonospora* в различных природных субстратах.

Для определения популяционной структуры микромонопор использовали количественный учет двух типов колониеобразующих единиц (КОЕ) - мицелия и спор - на стеклах обрастания после окрашивания акредином оранжевым. В этом случае исходными данными служили показатели вероятности взаимоперехода двух типов КОЕ за семисуточный интервал. В качестве модели, описывающей динамику структуры, использовалась стохастическая марковская цепь (Кожевин, 1989).

Для наблюдения за динамикой численности представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora* в слоях подстилки и в верхних горизонтах оторфованной подзолистой профильно-оглеенной (так называемой белоподзолистой) почвы и бурозема в ходе сукцессии, инициированной увлажнением, в лаборатории был заложен модельный опыт, при проведении которого мы преследовали следующие цели: определить характер межпопуляционных взаимодействий и экологической стратегии представителей 2-х родов актиномицетов *Streptomyces* и *Micromonospora*; выявить благоприятные и неблагоприятные для выделения этих популяций пространственно-временные интервалы. Сукцессию инициировали в подстилке и почве увлажнением до 60% от полевой влагоемкости. Образцы отбирали на 0 (сразу после увлажнения), 14,30 и 60-е сутки опыта с момента инициирования сукцессии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Распределение численности микромоноспор по вертикально-ярусной структуре биогеоценозов основных почвенно-климатических зон

В исследованных хвойных лесных биомах численность микромоноспор была наиболее высокой в растительном ярусе и нижних слоях подстилки (F+N), где идет активная минерализация и накопление органического вещества, и составляла десятки и сотни КОЕ/г (рис. 1).

Численность стрептомицетов в хвойных лесах, так же как и численность микромоноспор, была наиболее высокой на растениях и в подстилке.

Относительное преобладание микромоноспоровых актиномицетов отмечено нами для листостебельных мхов. Численность микромоноспор в мохостое достигала  $2,0 \times 10^4$  КОЕ/г мха в хвойных лесах гумидной зоны, а доля их в актиномицетиомицетном комплексе на поверхности мхов составила 40 - 50%.

В лиственных биомах микромоноспоры, так же как и в хвойных лесах, численно преобладали в подстилке, их численность достигала  $3,6 \times 10^5$  КОЕ/г субстрата, что на три порядка выше, чем в почвенном ярусе. На растениях и в почве лиственных биомов микромоноспоры составляли минорный компонент актиномицетного комплекса, а в хвойных лесных биомах микромоноспоры наряду со стрептомицетами доминировали во всех ярусах кроме почвенного (рис. 2). В наземном ярусе исследованных лиственных лесных биомов микромоноспоры выделялись только с поверхности коры липы, что соответствует литературным данным об обнаружении микромоноспор на стволах деревьев.

Численность микромоноспор на растениях хвойных БГЦ была достаточно высока  $2,2 \times 10^4$  КОЕ/г, однако, микромоноспоры встречались лишь в 36% исследованных образцов и обнаруживались на хвое ели, листьях можжевельника, папоротника, черники только в одном из 5 обследованных лесных биогеоценозов - ельнике-черничнике в Окском заповеднике.

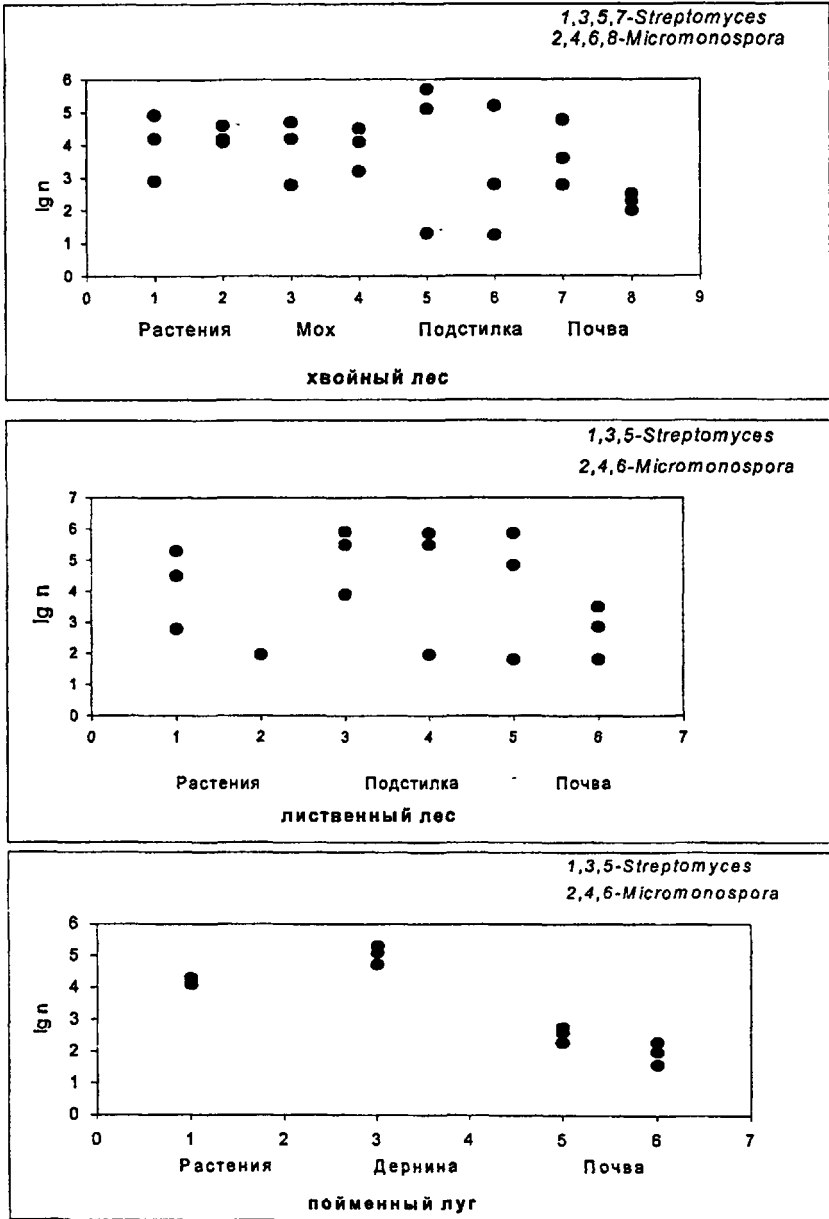


Рис. 1. Средние значения и пределы колебания численности актиномицетов в различных биогеоценозах

Вероятно, поверхность живых растений в лесных биогеоценозах является достаточно случайной средой обитания для микромоноспор, которые могут попадать сюда с частичками пыли, каплями дождя, токами воздуха.

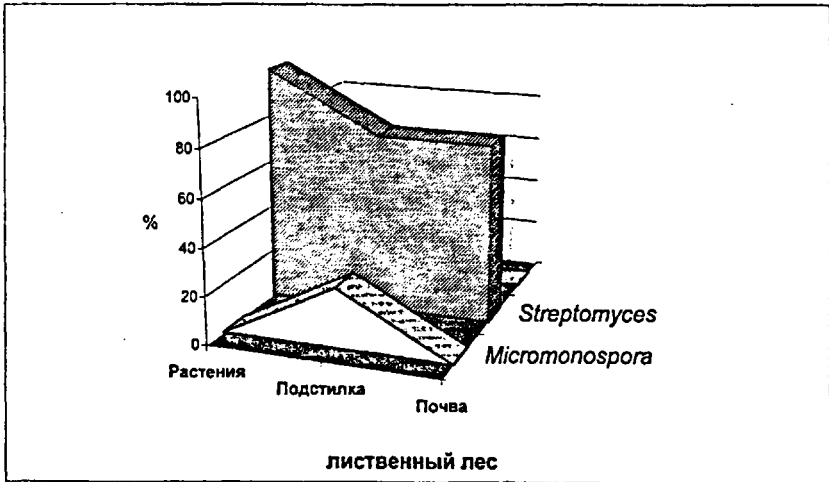
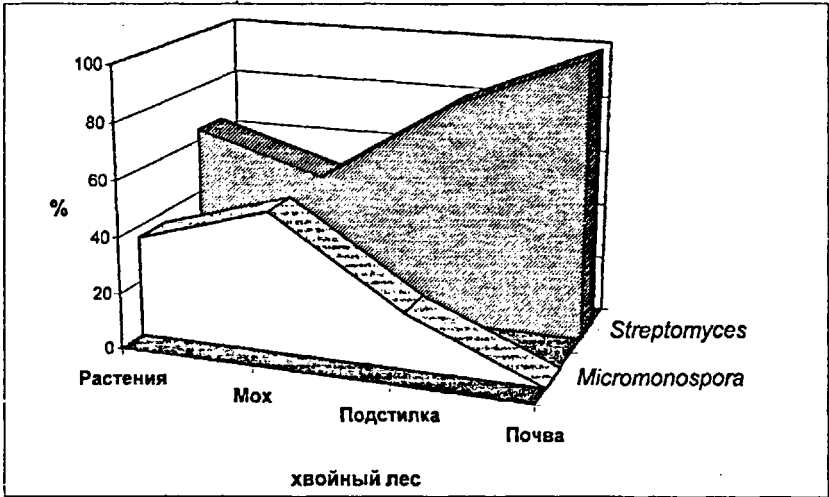


Рис. 2. Частота доминирования стрептомицетов и микромоноспор в лесных биогеоценозах

Приуроченность микромоноспор к растительным субстратам (мох) и растительным остаткам (подстилка), ранее не отмечавшаяся в литературе,

объясняется тем, что некоторые виды микромонопор, демонстрирующие хороший рост на ксилозе и арабинозе, подобно другим представителям группы актиноплан, способны разлагать пентозаны растительного происхождения.

Таким образом, в исследованных лесных биогеоценозах микромонопоры встречаются во всех элементах вертикально-ярусной структуры. В лиственных лесах микромонопоры концентрируются в наземном ярусе, включая моховой слой, составляя здесь, наряду со стрептомицетами, доминирующий компонент актиномицетного комплекса. Микромонопоровые актиномицеты, выделяющиеся на среде с пропионатом натрия из лесной подстилки под еловым лесом, были отнесены к группам: *Aurantiaca*, *Cinnamomea*, *Cinnamomea-vinacea*, из почвы - к группам *Aurantiaca*, *Cinnamomea-vinacea*.

В луговом биогеоценозе в пойме р. Пра представители рода *Micromonospora* обнаружены только в почвенных горизонтах (рис. 1). Нам не удалось обнаружить монопоровые актиномицеты в растительном ярусе и дерновом горизонте лугового биогеоценоза. Очевидно, специфические природные условия, в которых сформировался этот пойменный луг (подстилкается песчаными отложениями, промывной водный режим) обусловили то, что гидрофильные споры микромонопор легко вымываются из верхних ярусов биотопа в нижележащие слои почвы.

Для исследованных степных биомов характерна непрерывность в распространении микромонопор по вертикальной структуре биогеоценозов. Здесь они, наряду со стрептомицетами, доминируют не только в напочвенном, но и в почвенном ярусе (рис. 3), в то время как в почве лесных биомов микромонопоры составляли лишь минорный компонент. Наибольшее количество микромонопор приурочено к напочвенному и почвенному ярусу (рис. 4). В почвенном ярусе микромонопоры и стрептомицеты в актиномицетном комплексе представлены примерно в равных долях, численность их достигает  $5,1 \times 10^4$  и  $8,3 \times 10^4$  КОЕ/г соответственно. Ярусом наибольшей

концентрации микромонопор в степных биомах является напочвенный, а точнее, поверхность степного войлока.

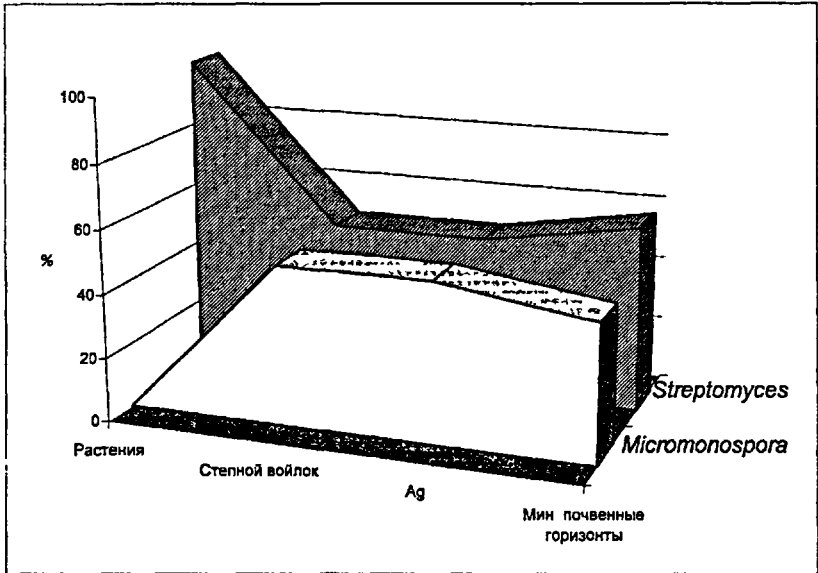


Рис.3. Частота доминирования актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* в степных биогеоценозах.

Численность микромонопор в степном войлоке в 3 - 5 раз, а в ковыльной степи в 10 раз, превосходит численность стрептомицетов и составляет до 93% от всех выделенных актиномицетов (рис. 5). Очевидно, войлок в степи, так же как и подстилка в лесу, отличаясь особым водным и газовым режимом, является преимущественным местом обитания микромонопор, многие виды которых обладают гидрофильными спорами и являются микроаэрофилами.

Характер распределения микромонопор по вертикальной структуре сухой полынно-типчаковой степи на каштановой остаточно-солонцеватой почве в целом подчиняется закономерностям, установленным для этих организмов в разнотравно-злаковой и ковыльной степях. Микромонопоры обнаружены на поверхности сухих растений (полынь, типчак) и в почвенном ярусе (но не во всех его горизонтах). Максимальная доля микромонопор прихо-

дится на карбонатный (46%) и гипсовый (76%) горизонты. Это объясняется тем, что ионы кальция инициируют прорастание спор актиномицетов, вообще, и микромоноспор, в частности. В степных биогеоценозах преобладают виды микромоноспор, принадлежащих к цветовым группам *Aurantiaca*, *Cinnamomea-olivacea*, *Brunnea*.

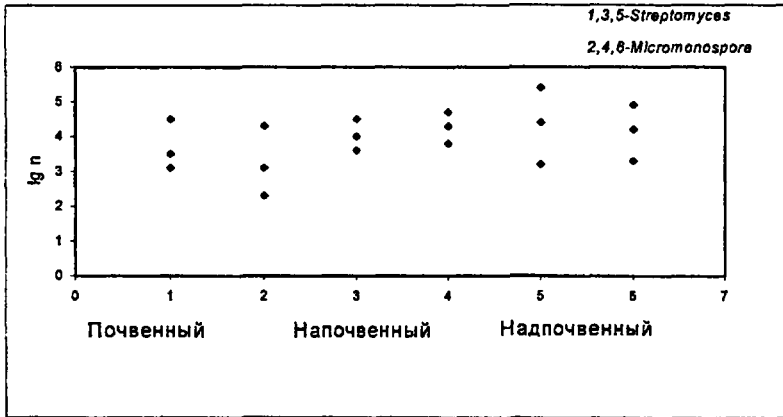


Рис.4. Средние значения и пределы колебаний численности актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* в степных биогеоценозах

Наиболее перспективными для поиска продуцентов антибиотиков являются представители групп *Aurantiaca*, *Cinnamomea*, *Nigra*. Вероятно, способность к антибиотикообразованию, антибиотикоустойчивость обусловили приоритетное распространение этих форм в почвах в условиях конкуренции за субстрат.

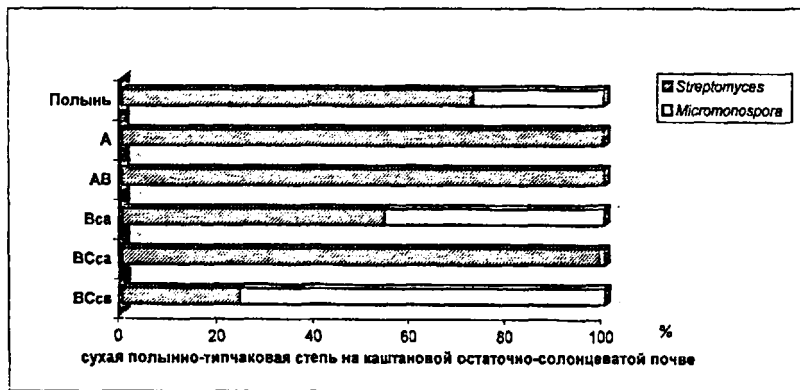
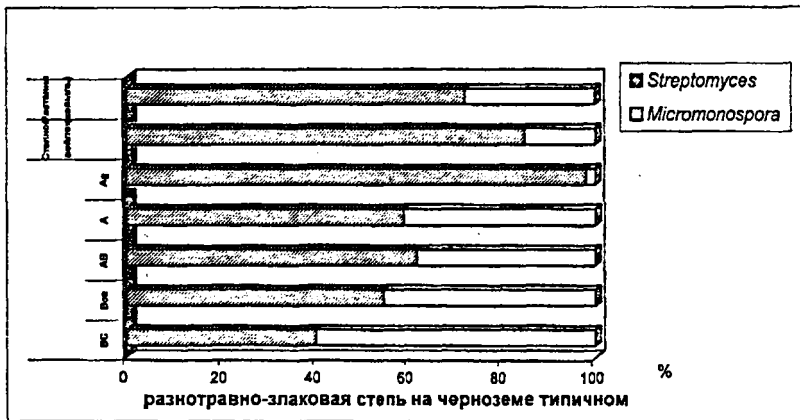
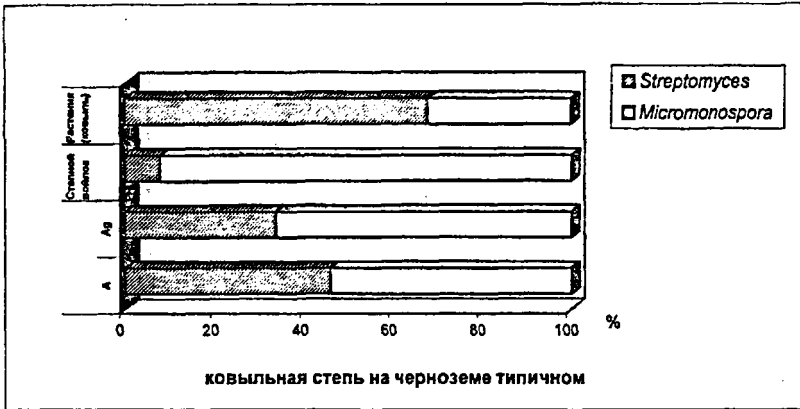
Исследованные пустынные биогеоценозы характеризуются постоянным присутствием во всех ярусах микромоноспоровых актиномицетов. Микромоноспоры с высокой частотой доминирования распространены на поверхности живых и сухих частей растений и в верхнем горизонте почвы (0 - 1 см) в пустынных экосистемах Кызылкумов, на поверхности растений и корней в экосистемах пустыни Негев и в Каракумах - во всех элементах вертикально-ярусной структуры экосистем. Таким образом, растения являются той экологической нишей, где микромоноспоры с высокой частотой домини-

рования обнаруживаются во всех исследованных пустынных экосистемах (рис. 6).

Соотношение между стрептомицетами и микромоноспорами в пустынных биогеоценозах меняется в зависимости от типа субстрата. На поверхности живых и отмерших побегов пустынных растений относительное обилие микромоноспор колебалось в очень широких пределах по индивидуальным образцам. Так, в песчаной пустыне на поверхности побегов пустынных растений (саксаул, песчаная акация) доминируют микромоноспоры; в глинистой пустыне побеги джужгуна и эфедры, ветви и листья солянок равномерно заселены как стрептомицетами, так и микромоноспорами; в растительном ярусе пустыни Негев микромоноспоры составляют лишь 16% от общей численности мицелиальных прокариот. На корнях растений средняя доля микромоноспор составляла лишь 1% в солянково-попынной пустыне Кызылкум, но достигала 70% в исследованных биотопах пустыни Негев. В поверхностной корке пустынных почв микромоноспоры были немногочисленны. Исключение составил поверхностный слой пустынно-песчаной почвы под саксаульником (Каракумы), все образцы которой взяты из-под слоя опада (рис.7). Относительное обилие стрептомицетов и микромоноспор здесь были примерно одинаковыми.

Наибольшая численность моноспоровых актиномицетов была обнаружена в образце мха *Tortula desertorum* на поверхности закрепленных песков в Каракумах ( $2,2 \times 10^6$  КОЕ/г), что в 10 раз превышает здесь численность стрептомицетов и составляет 85% от всех актиномицетов в комплексе. Таким образом, обобщив наши данные, можно сделать вывод, что микромоноспоры встречаются и доминируют во всех без исключения моховых разрастаниях различных биогеоценозов. Таким образом, выявлена общая закономерность для всех исследованных экосистем - микромоноспоры оказываются доминирующими формами в субстратах, связанных с растениями; для лесных биомов - это подстилка, мох, для степных - степной войлок; для пустынных - сухие растения.





Л/с 5. Распределение процентного соотношения актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* по ярусам степных биогеоценозов .

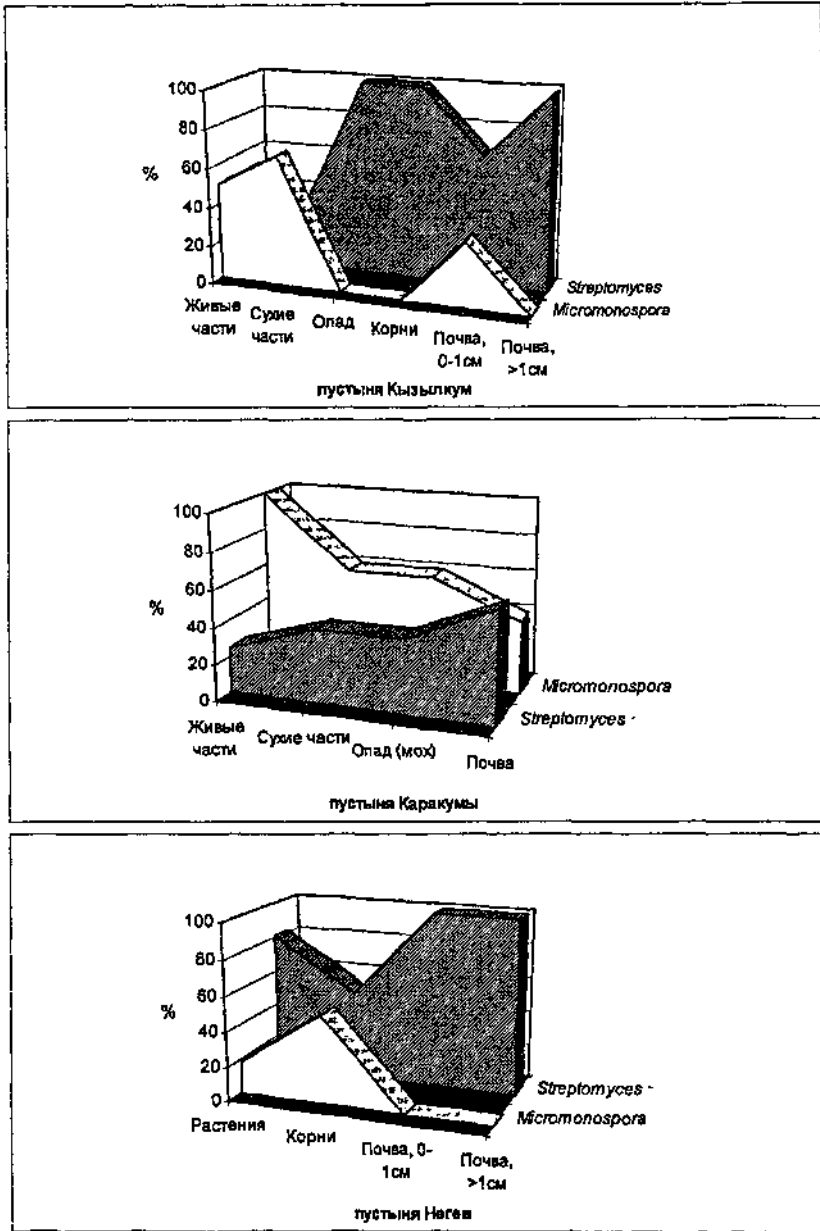


Рис. 6. Частота доминирования актиномицетов родов *Streptomyces* и *Microtonospora* в пустынных биогеоценозах

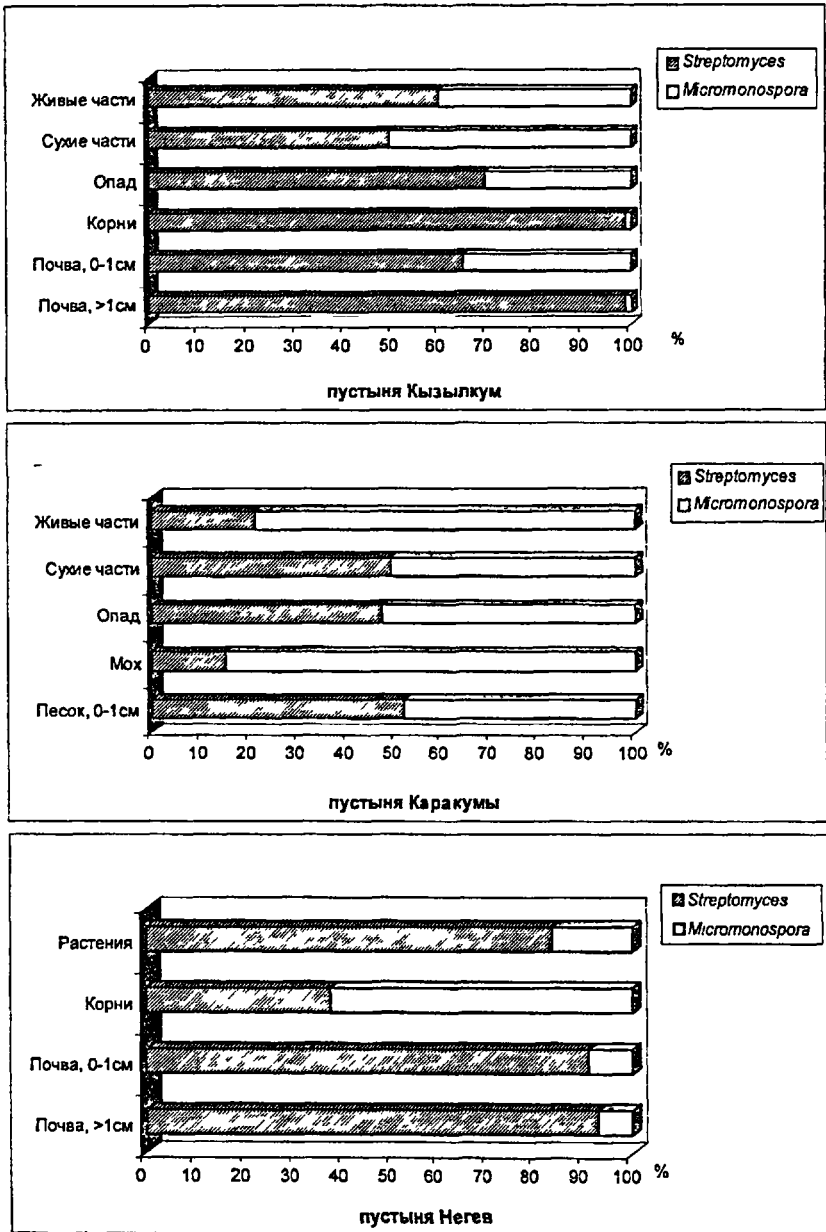


Рис 7. Распределение процентного соотношения актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* по ярусам пустынных биogeocoenозов

Влияние деятельности животных на распространение актиномицетов в пустынных ландшафтах оценивали в джугуннике осоковом в пустыне Кызылкум. В этом биотопе было встречено скопление подземных термитников и муравейников. В результате жизнедеятельности этих беспозвоночных в почве возникают многочисленные локусы концентрации органического вещества в виде привнесенных муравьями и термитами растительных остатков и их экскрементов. В песке, обогащенном экскрементами термитов, плотность микромонопор достигала  $10^7$  КОЕ/г, на порядок превосходя численность стрептомицетов и составляя здесь 93% от всех выделенных актиномицетов. Интересно, что в экскрементах млекопитающих также обнаружено высокое относительное обилие микромонопор, хотя общая численность мицелиальных прокариот здесь не превышала  $10^4$  КОЕ/г.

Во всех исследованных пустынных биотопах большинство (86%) микромонопор было представлено черноокрашенными формами группы *Nigra*. Последние были обнаружены во всех типах субстратов за исключением гипсовых горизонтов серо-бурых пустынных почв на глубине  $>30$  см. Образование темноокрашенных пигментов в сочетании с известной устойчивостью к высушиванию можно рассматривать как адаптационные приспособления микромонопор к обитанию в условиях пустынь.

#### **Анализ популяционной структуры актиномицетов рода *Micromonospora***

Микромонопоры - организмы со сложным жизненным циклом, поэтому помимо общих показателей обилия микромонопор в почве, важно знать структуру популяции (споры - мицелий) *in situ*.

Долгосрочный прогноз популяционной структуры микромонопор можно дать на основе модели - цепи Маркова, в которой все будущее развитие системы зависит только от настоящего состояния (Кожевин, 1989). Располагая данными о динамике объекта после внесения в почву отдельно спор и мицелия (уровень внесения около  $10^7$  КОЕ/г почвы), цепь Маркова в дан-

ном случае можно представить следующим образом (рис. 8). Марковская цепь оперирует с вероятностями и относится к стохастическим моделям.

Возьмем в качестве временного шага 7-суточный интервал. В эксперименте за это время в варианте с внесением спор 97% единиц по-прежнему представлены спорами, а 3% - мицелием. Если же в почву вносили только мицелий, то через 7 суток споры и мицелий составляли 40% и 60% соответственно.

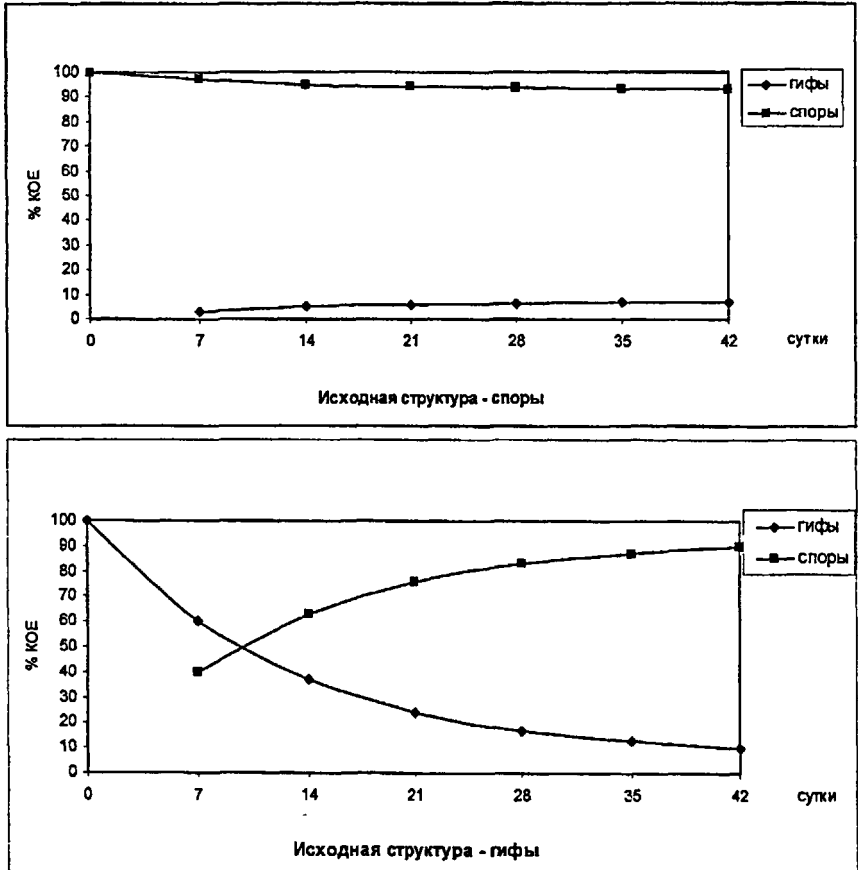


Рис 8. Прогноз изменений популяционной структуры

Предполагая, что вероятности перехода не меняются со временем, составили и проанализировали матрицу. Анализ переходной матрицы показывает, что в конечном счете равновесный фактор вероятностей равен /0,93; 0,07/, т.е. в стационарной структуре микромонопор примерно 93% колониеобразующих единиц представлены спорами, а мицелиальные единицы составляют 7%. Для сравнения (Кожевин, 1989): в популяционной структуре *Streptomyces olivocinereus* 99,4% единиц представлены спорами, а мицелиальные единицы составляют только 0,6%. Эти данные согласуются с особенностями жизненных циклов популяций стрептомицетов и микромонопор и объясняются различиями в экологической стратегии полиспоровых (род *Streptomyces*) и моноспоровых (род *Micromonospora*) актиномицетов, меньшим у микромонопор (по сравнению со стрептомицетами) числом спор, которые медленнее прорастают. Замечательной особенностью равновесия является наличие в популяции микромонопор активного компонента - гиф.

Основываясь на полученных данных о популяционной структуре микромонопор в черноземе, можно оценить биомассу мицелия и биомассу спор в почве: биомасса мицелия моноспоровых актиномицетов составляет -  $1,25 \times 10^{-8}$  г/г почвы; биомасса спор  $\sim 7,44 \times 10^{*8}$  г/г почвы. Как видно, несмотря на небольшую долю гиф (около 7%), их биомасса сравнима с биомассой спор и играет значительную роль в экологических функциях данной популяции. Определено время генерации мицелия микромонопор, которое составляет примерно 19 суток.

### **Использование сукцессионного подхода для экологической характеристики актиномицетов рода *Micromonospora***

Наблюдали за динамикой численности актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* в ходе сукцессии, инициированной увлажнением подстилки елового леса на белоподзолистой почве и на буроземе. Отметим некоторые общие закономерности, проиллюстрировав их на примере биогеогори-

зонта с максимальной численностью микромонопоровых актиномицетов подстилки белоподзолистой почвы (рис. 9).

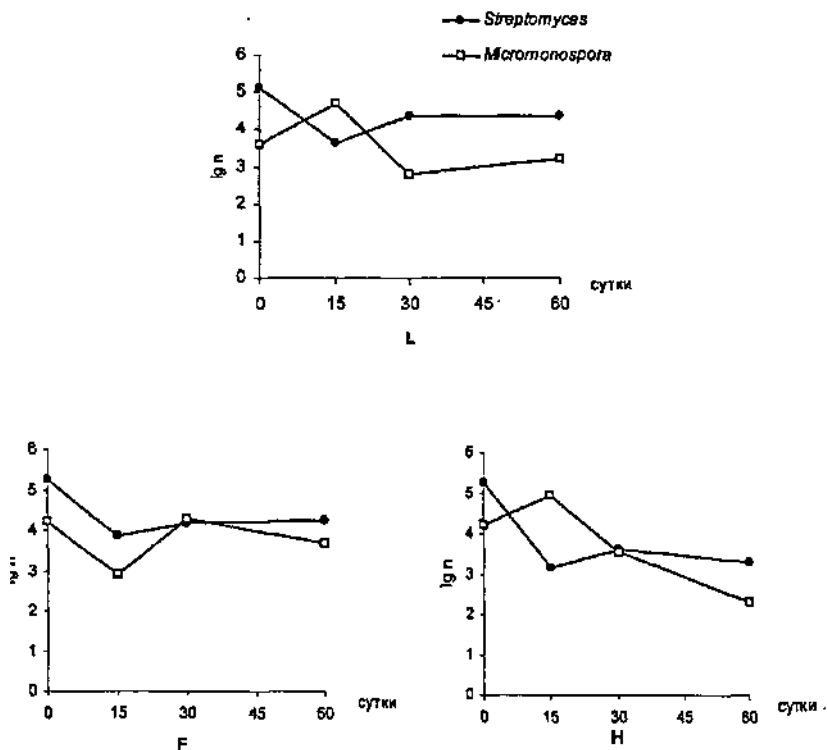


Рис.9. Динамика численности актиномицетов родов *Streptomyces* и *Micromonospora* в ходе сукцессии, инициированной увлажнением подстилки в ельнике на белоподзолистой почве

Для представителей рода *Streptomyces* максимальный показатель плотности популяции для всех слоев подстилки зарегистрирован в 0 момент и на 30-е сутки опыта с последующей стабилизацией числа КОЕ/г субстрата на поздних этапах сукцессии. На 15-е сутки опыта после инициирования сукцессии приходится резкий спад популяционной плотности стрептомицетов. Обратная картина наблюдалась для представителей рода *Micromonospora*,

вспышка которых приходится на промежуточные этапы сукцессии с последующим постепенным спадом численности к 60-м суткам опыта. Таким образом, можно сказать, что представители каждого рода занимают доминирующее положение в актиномицетном комплексе на определенной стадии сукцессии, что может свидетельствовать об их поэтапном участии в процессах разложения растительных остатков.

Для образцов белопodzолистой почвы и бурозема был проведен корреляционный анализ, выявивший резкую отрицательную связь стрептомицетов и микромоноспор (коэффициент корреляции = -0,8) в нижних слоях подстилки (т.е., чем больше представителей одного рода, тем меньше других), что свидетельствует об интенсивных конкурентных взаимоотношениях популяций в этом местообитании. Как показал корреляционный анализ, в почве и в слое подстилки L конкурентные межпопуляционные взаимодействия отсутствуют.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны селективные приемы выделения актиномицетов рода *Micromonospora* из почв и растительных субстратов, заключающийся в использовании предпосевной обработки почвенных и растительных суспензий, использовании селективных сред с добавлением комплекса антибиотиков, длительной инкубации посевов.

2. Впервые разработан экспрессный газохроматографический- хромато-масс-спектрометрический метод выявления микромоноспор в почве.

3. Впервые показано, что актиномицеты рода *Micromonospora*, наряду со стрептомицетами, являются неотъемлемыми компонентами почвенных актиномицетных комплексов всех изученных биогеоценозов основных почвенно-климатических зон и не являются "редкими" (редкообнаруживаемыми) формами.

4. Выявлено доминирование микромоноспор в актиномицетном комплексе субстратов, связанных с растительными остатками (подстилка, войлок, дернина).



5. Видовой состав микромонопор в различных почвах обследованных биогеоценозов неоднороден. Виды групп *Aurantiaca* встречаются во всех изученных почвах. К пустынным почвам приурочены черноокрашенные виды группы *Nigra*. Из почв, сформированных под степью, выделяли культуры группы *Coerulea*. Виды группы *Bgunnea* редко встречались в почвах, в основном в степных биогеоценозах.

6. Впервые для актиномицетов рода *Micromonospora* проведен анализ популяционной структуры (споры-мицелий) на основе данных прямой люминесцентной микроскопии. С помощью стохастической марковской модели установлено, что в равновесных условиях в популяционной структуре примерно 93% колониобразующих единиц представлено спорами, 7% - мицелием.

7. Наблюдения за динамикой популяций стрептомицетов и микромонопор в ходе сукцессии в лесных почвах и подстилках позволяют выявить конкурентные взаимоотношения между стрептомицетами и микромонопорами в нижних слоях подстилки, установить различия эконош этих актиномицетов, связанные с признаками относительной К-стратегии у микромонопор, и выраженной приуроченностью этих мицелиальных прокариот к обитанию в субстратах, связанных с растениями.

#### *СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*

1. Дедыш С.Н., Зенова Г.М., Добровольская Т.Г., Грачева Т.А. Структура альгоценозов, формирующихся в периоды "цветения" почвы //Альгология. 1992.Т.2.№.2.С.63-69
2. Добровольская Т.Г., Чернов И.Ю., Лысак Л.В., Зенова Г.М., Грачева Т.А., Звягинцев Д.Г. Бактериальные сообщества пустыни Кызылкум: пространственная дисперсия и таксономический состав // Микробиология. 1994. Т.63.№.2.С.334-343

3. Зенова Г.М., Грачева Т.А., Лихачева А.А. Актиномицеты рода *Micromonospora* в наземных экосистемах // Микробиология. 1994. Т.63. №.3. С.553-560
4. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М., Широких И.Г., Лихачева А.А., Грачева Т.А. Экологическая оценка состояния актиномицетных комплексов биогеоценозов на осушенных низинных торфяниках // Микробиология. 1995. Т.64. №1. С.88-96
5. Зенова Г.М., Штина Э.А., Дедыш С.Н., Глаголева О.Б., Лихачева А.А., Грачева Т.А. Экологические связи водорослей в биоценозах // Микробиология 1995.Т.64. №2. С.149-164
6. Зенова Г.М., Грачева Т.А., Маслова Е.М., Звягинцев Д.Г. Актиномицеты рода *Streptosporangium* в лесных и луговых экосистемах // Микробиология. 1995. Т.64 №3. С.811-814
7. Грачева Т.А. Распространение актиномицетов рода *Micromonospora* в наземных экосистемах // Тезисы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-96». М. 1996. С. 21.
8. Зенова Г.М., Чернов И.Ю., Грачева Т.А., Звягинцев Д.Г. Структура актиномицетных комплексов в пустынях // Микробиология. 1996. Т.65. №5. С.704-710
9. Зенова Г.М., Грачева Т.А., Манучарова Н.А., Звягинцев Д.Г. Актиномицетные сообщества лесных экосистем // Почвоведение. 1996. Т.65. №11. С.1347-1351
10. Зенова Г.М., Лихачева А.А., Грачева Т.А., Грядунова А.А. Актиномицеты рода *Micromonospora* в аллювиально-луговой и низинной торфяной почвах // Почвоведение. 2004. (в печати)

Издательство ООО "МАКС Пресс".  
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.  
Подписано к печати 06.04.2004 г.  
Формат 60x90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 364.  
Тел. 939-3890,939-3891,928-1042. Тел./факс 939-3891.  
119992, ГСП-2, Москва,  
Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова.

№10472