

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ / AGRICULTURAL MICROBIOLOGY AND MYCOLOGY

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.5.799-809>
УДК 579.87



Изучение агрономически ценных синергетических эффектов в бинарных культурах почвенных стрептомицетов

© 2023. Н. А. Боков✉, Р. И. Абубакирова, И. Г. Широких
ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н. В. Рудницкого», г. Киров, Российская Федерация

Совместное культивирование микроорганизмов может быть действенным способом управления их ферментативной активностью и синтезом вторичных метаболитов, базирующимся на явлении синергизма. В работе проведена оценка влияния совместного культивирования в различных сочетаниях четырех местных изолятов рода *Streptomyces* на их целлюлазную активность, антифитопатогенное и фиторегуляторное действие. Штаммы *S. antimycoticus* 8A13 и *Streptomyces* sp. H 27-25 проявляли антагонистическое действие по отношению к грибам рода *Fusarium* и *Alternaria*. В составе бинарных культур присутствовали штамм-целлюлозолитик и штамм-антагонист. Существенно более высокую целлюлазную активность в сравнении с монокультурой (3800 усл. ед./10 мин /г) продемонстрировала бинарная ассоциация штаммов *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. antimycoticus* 8A13 (13215 усл. ед./10 мин/г). При сокультивировании этих изолятов отмечено также увеличение антифунгальной активности бинарной культуры (18,76±6,1 мм) по сравнению с входящим в ее состав *S. antimycoticus* 8A13 (11,09±6,39 мм). Средняя величина зон ингибирования роста фитопатогенных грибов (18,76±6,1 мм) была сопоставима с таковыми у препарата сравнения – коммерческого антимикотика тербинафина (19,8±6,2 мм). Бинарные искусственные ассоциации в тестах на фиторегуляторное действие, как и монокультуры входящих в них изолятов стрептомицетов, не оказали существенного влияния на всхожесть и морфометрию проростков пшеницы. Отсутствие фитоингибирующего действия бинарной культуры *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. antimycoticus* 8A13, при сочетании таких агрономически ценных свойств, как целлюлазная активность и антагонизм к фитопатогенным грибам, дают основание к ее использованию для разработки почвоулучшающего биопрепарата. Дальнейшее изучение свойств бинарной ассоциации, в частности возможности ее комбинации с PGPR-бактериями (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), составит предмет дальнейших исследований.

Ключевые слова: актиномицеты, совместное культивирование, целлюлазная активность, антагонизм, фиторегуляторная активность

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого» (тема № FNWE-2022-0005).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Боков Н. А., Абубакирова Р. И., Широких И. Г. Изучение агрономически ценных синергетических эффектов в бинарных культурах почвенных стрептомицетов. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2023;24(5):799-809. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.5.799-809>

Поступила: 26.06.2023 Принята к публикации: 02.10.2023 Опубликовано онлайн: 30.10.2023

Study of agronomically valuable synergistic effects in binary cultures of soil streptomycetes

© 2023. Nikita A. Bokov✉, Roza I. Abubakirova, Irina G. Shirokikh
Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Kirov,
Russian Federation

Co-culturing of microorganisms can be an effective way to control their enzymatic activity and synthesis of secondary metabolites based on the phenomenon of synergism. The effect of co-culturing in different combinations of four local *Streptomyces* isolates on their cellulase activity, antifitopathogenic and phyto regulatory effects was evaluated. Strains *S. antimycoticus* 8A13 and *Streptomyces* sp. H 27-25 exhibited an antagonistic effect against fungi of the genus *Fusarium* and *Alternaria*. Binary cultures were composed so that the cellulolytic and antagonist strains were present. Significantly higher cellulase activity in comparison with monoculture (3800 units/10 min/g) was demonstrated by the binary association of strains *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. antimycoticus* 8A13 (13215 units/10 min/g). When these isolates were co-cultured, an increase in the antifungal activity of the binary culture (18.76±6.1 mm) compared to that of its constituent *S. antimycoticus* 8A13 (11.09±6.39 mm)

was also noted. The mean value of the growth inhibition zones of phytopathogenic fungi (18.76±6.1 mm) was comparable with that of the reference preparation, the commercial antimycotic terbinafine (19.8±6.2 mm). Binary artificial associations in tests for phyto regulatory action, as well as monocultures of their constituent streptomycete isolates, had no significant effect on germination and morphometry of wheat seedlings. The absence of phytoinhibitory effect of the binary culture *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. antimycoticus* 8A13, combined with agronomically valuable properties such as cellulase activity and antagonism to phytopathogenic fungi give grounds for its use for the development of a soil-improving biopreparation. Further study of the properties of the binary association, in particular, the possibility of its combination with PGPR-bacteria (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), will constitute the subject of further research.

Keywords: actinomycetes, co-cultivation, cellulase activity, antagonism, phyto regulatory activity

Acknowledgements: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky (theme No. FNWE-2022-0005).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Bokov N. A., Abubakirova R. I., Shirokikh I. G. Study of agronomically valuable synergistic effects in binary cultures of soil streptomycetes. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2023;24(5):799-809. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.5.799-809>

Received: 26.06.2023

Accepted for publication: 02.10.2023

Published online: 30.10.2023

Взросший в последнее время в аграрном секторе спрос на биологические препараты стимулирует интерес к поиску все новых продуцентов биологически активных соединений, способствующих повышению урожайности и качества сельскохозяйственных культур при сохранении экологического состояния агроценозов [1]. Почвенные мицелиальные бактерии – актиномицеты, в особенности представители самого распространенного в почвах рода *Streptomyces*, являются продуцентами рекордного среди прокариот количества антибиотиков, способных оказывать влияние на фитопатогенные организмы. Экологические функции стрептомицетов связаны также с разложением в почве растительных полимеров, основная доля которых представлена целлюлозой. Однако комплекс целлюлазных ферментов стрептомицетов используется довольно ограниченно не только в промышленных, но и аграрных технологиях. Адаптированные к почвенным условиям стрептомицеты могут служить основой к созданию почвоулучшающих препаратов, способствующих быстрому разложению в агроценозах растительных остатков и сокращению пула почвенных инфекций.

Бактерии рода *Streptomyces* богаты кластерами биосинтетических генов, большинство из которых еще не изучены или изучены слабо [2]. Наряду с функционирующими генами, у стрептомицетов распространены кластеры так называемых «спящих» биосинтетических генов [3], которые не всегда экспрессируются, что ограничивает метаболический потенциал агрономически ценных штаммов, растущих в лабораторных условиях в виде монокультур.

Совместное культивирование разных видов бактерий *in vitro* отчасти моделирует сложные природные межорганизменные взаимодействия с помощью секретируемых в окружающую среду метаболитов и сигнальных молекул [4, 5]. Рядом авторов было показано, что при сокультивировании микробных культур может происходить активация «спящих» генов, что приводит к увеличению выхода и разнообразия микробных метаболитов [6]. Так, совместное культивирование *Streptomyces* sp. MA37 и *Pseudomonas* sp. привело к продукции нескольких метаболитов, которые ранее не были выявлены в монокультурах каждой из бактерий [3]. В результате совместного культивирования *Streptomyces albireticuli* MDJK11 и *Streptomyces albofavius* MDJK44 повысилась способность штаммов к мобилизации фосфора и стимуляции роста корней и проростков пшеницы [7]. С помощью совместного культивирования бактерий *Streptomyces tendae* КМС006 и *Gordonia* sp. КМС005 был выделен новый ациклический полиеновый поликетид с антимикробной активностью в отношении *Micrococcus luteus* и *Enterococcus hirae* [8].

Приведенные из литературы примеры синергетических эффектов бинарных культур стрептомицетов позволяют рассматривать совместное культивирование как простой и достаточно эффективный способ, позволяющий обнаруживать новые вторичные метаболиты, а также повышать выход ранее известных соединений. Совместное культивирование может дополнить или даже частично заменить такие традиционные методы стимуляции продукции метаболитов и ферментов, как оптимизация условий культивирования [9, 10] или

генная инженерия [11, 12], которые являются значительно более трудоемкими и дорогостоящими. Вместе с тем, информации о том, позволяет ли совместное культивирование регулировать уже имеющиеся агрономически ценные свойства штаммов за счет синергетических эффектов, в отечественной научной литературе пока недостаточно.

Цель работы – провести сравнительную оценку монокультур четырех местных штаммов стрептомицетов с полученными на их основе тремя бинарными ассоциациями по параметрам целлюлазной и антимикробной активности, фиторегуляторной способности.

Научная новизна – в работе впервые для местных почвенных изолятов рода *Streptomyces* продемонстрирована возможность увеличения целлюлазной активности и её пролонгации во времени, усиления антифунгального действия в отношении грибных фитопатогенов с помощью попарного объединения штаммов в бинарных культурах. Отсутствие фитотоксических эффектов при совместном культивировании стрептомицетов позволяет рассматривать полученные искусственные ассоциации как основу для создания биопрепарата с почвоулучшающим действием.

Материал и методы. Объектами исследования служили четыре природных изолята бактерий, выделенные из почв разных типов с использованием селективного приема на среде с гидролизатом казеина¹. На основании изучения культуральных и морфологических свойств

все штаммы были отнесены к роду *Streptomyces*. С помощью секвенирования последовательностей фрагмента гена 16S рРНК для трех изолятов определено филогенетическое положение. Последовательности депонированы в международной генетической базе NCBI. Характеристика изолятов приведена в таблице 1.

В предыдущих исследованиях две культуры (штаммы Мб 4-2 и 1.3) проявили целлюлазную активность [13, 14], два других (штаммы 8А13 и Н 27-25) отличались выраженным антифунгальным действием по отношению к грибам родов *Fusarium* и *Alternaria* [15]. С учетом выявленных у изолятов агрономически ценных свойств были составлены три бинарные культуры, в которых один микроорганизм являлся антагонистом по отношению к фитопатогенам, а другой – активным целлюлолитиком: 1) *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. antimycoticus* 8А13; 2) *S. thermocarboxyodus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8А13; 3) *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *Streptomyces* sp. Н 27-25. Инокуляты для объединения в бинарных культурах получали, используя жидкую питательную среду Гаузе-1². Штаммы культивировали при 28 °С стационарно в течение 5 суток. Титры пропагул в полученных жидких культурах (ЖК) составили для *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, *S. antimycoticus* 8А13, *S. thermocarboxyodus* 1.3 и *Streptomyces* sp. Н 27-25 соответственно $2,5 \times 10^7$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^8$ и $2,5 \times 10^6$. Для получения бинарных культур инокуляты разных штаммов вносили в соответствующую питательную среду в равных объемах.

Таблица 1 – Источники выделения и результаты идентификации изолятов / Table 1 – Sources of isolation and results of isolate identification

Штамм / Strain	Источник выделения: почва, географический пункт / Source of isolation: soil, geographical location	Филогенетическое положение штамма / Phylogenetic position of the strain	Номер в NCBI / NCBI number
Мб 4-2	Подзол песчаный мелкий на древнеаллювиальных песках, Медведский бор, Кировская обл. / Fine sandy podzol on ancient alluvial sands, Medvedsky Bor, Kirov region	<i>S. griseoaurantiacus</i>	ON164840.1
1.3	Выработанный торфяник низинного типа, п. Оричи, Кировская область / Exhausted peat bog of lowland type, Orichi village, Kirov region	<i>S. thermocarboxyodus</i>	ON164813.1
8А13	Дерново-подзолистая почва из ризосферы табака, г. Киров / Soddy-podzolic soil from the rhizosphere of tobacco, Kirov	<i>S. antimycoticus</i>	MT114717
Н 27-25	Серая лесная почва, г. Нижний Новгород / Gray forest soil, Nizhny Novgorod	<i>Streptomyces</i> sp.	Нет

¹Зенова Г. М. Почвенные актиномицеты: учебное пособие. М.: МГУ, 1992. 78 с.

²Там же.

Для определения целлюлазной и антимикробной активности, фиторегуляторного действия стрептомицеты выращивали в минеральной жидкой среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 2; NaCl – 2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1; $MnSO_4$ – 0,05; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 2. В качестве единственного источника углерода в жидкую среду вносили измельченную солому (10 г/л). Культивация осуществлялась при 28 °С стационарно в течение 5 суток для оценки антагонистической и фиторегуляторной активности. Определение ферментативной активности проводили через 24, 48, 72 и 144 часа от начала культивирования. Биомассу бактерий осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 6000 об./мин.

Целлюлазную активность определяли спектрофотометрически (540 нм) в супернатанте с использованием реактива на основе динитросалициловой кислоты (ДНС)³. В качестве субстрата служила микрокристаллическая целлюлоза (1 %). Реакцию гидролиза проводили при 50 °С в течение 20 мин. За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на субстрат в условиях ферментативной реакции за 1 час образуется 1 мкмоль редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозный эквивалент.

Для оценки антимикробного действия стрептомицетов выращивали тест-культуры фитопатогенных грибов и бактерий при 28 °С на скошенном агаре Чапека и среде RHM соответственно⁴. В качестве тест-культур использовали грибы: *Fusarium avenaceum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *Alternaria* sp., *Bipolaris sorokiniana* и бактерии: *Curtobacterium flaccumfaciens* 29r4, *Bacillus* sp. 29r3, *Pseudomonas fluorescens* 1A4, *Flavobacterium saccharophilum* 3A5, *Clavibacter michiganensis* H6, *Erwinia rhapontici*. Продолжительность культивирования для бактерий – 2 суток, для грибов – 7 суток. Биомассу каждой тест-культуры суспендировали, добавляя в пробирки по 5 мл стерильной воды, высевали газоном на чашки со средой соответствующего состава, раскладывали на поверхности питательной среды стерильные диски из фильтровальной

бумаги (ø 5 мм) и наносили на них по 10 мкл жидких культур стрептомицетов. В качестве препаратов сравнения использовали антибиотики с бактерицидным (канамицин, 30 мкг) и антимикотическим действием (тербинафин, 250 мкг). Зоны подавления роста измеряли через 24 часа для бактерий и через 48 часов для грибов. Все тесты проводили в трех повторениях.

Тест-культурой для оценки фиторегуляторного действия штаммов и их бинарных ассоциаций служила пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) сорта Приокская. Семена замачивали в ЖК бактерий при разведении 10^{-1} и 10^{-2} на 20 час, инкубировали при 28 °С. В контроле использовали семена, замоченные в дистиллированной воде и питательной среде без добавления инокулюма. Обработанные семена проращивали в водно-бумажной рулонной культуре при комнатной температуре (20 ± 2 °С) в течение 6 суток. Учитывали всхожесть, длину корня, высоту побега и сухую биомассу проростков. В каждом варианте теста в рулоны закладывали по 100 семян.

Для статистической обработки данных и построения графиков использовали программу Microsoft Excel. Результаты измерения зон ингибирования стрептомицетами тест-культур бактерий и грибов были визуализированы и подвергнуты кластерному анализу посредством тепловых карт, построенных с помощью веб-сервиса NGCHM-web-builder [16]. В тепловой карте отражены различия в величине зон ингибирования бактериальных и грибных тест-культур изолятами стрептомицетов по отдельности и в бинарных культурах. Столбцы обозначают различные штаммы стрептомицетов и полученные с их участием бинарные культуры. В качестве препарата сравнения использован антибиотик канамицин по отношению к бактериям и тербинафин к грибам.

Результаты и их обсуждение. Высокая активность и продолжительность действия целлюлазных ферментов, антифитопатогенное действие являются важными составляющими комплекса агрономически ценных свойств кандидатных штаммов для создания биопрепаратов почвоулучшающего действия.

³Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-442. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

⁴Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Динариева Т. Ю. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с. URL: <https://istina.msu.ru/publications/book/3330907/>

Целлюлазная активность. Динамика целлюлазной активности бинарной культуры, полученной на основе штаммов *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 и *S. antimycoticus* 8А13, отличалась от динамики тех же штаммов, выращенных в монокультурах. Пик целлюлазной активности для каждого штамма в отдельности

и при их совместном культивировании приходился на первые сутки инкубации (24 часа). В этот временной период целлюлазная активность бинарной культуры *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. antimycoticus* 8А13 была в 3,5 раза, а через 48 часов – в 6,5 раза выше, чем в монокультурах (рис. 1)

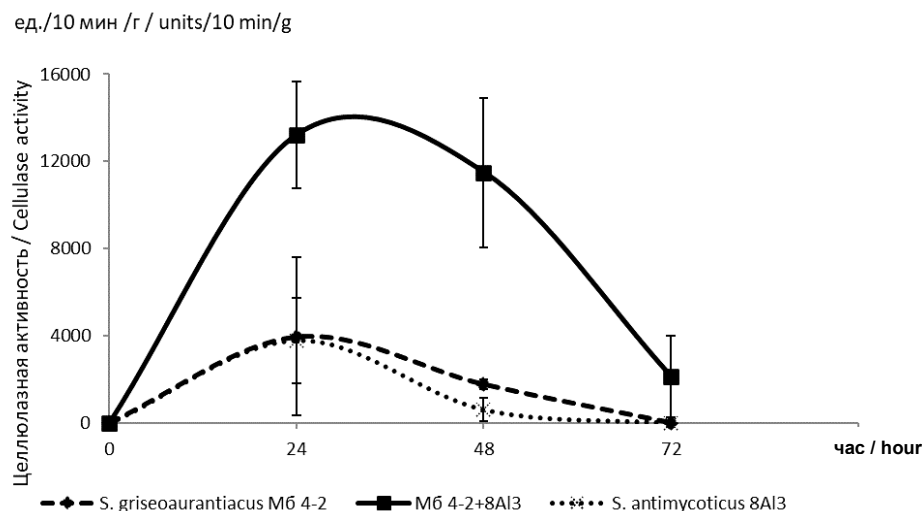


Рис. 1. Динамика целлюлазной активности изолятов *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, *S. antimycoticus* 8А13 в монокультурах и бинарной ассоциации на среде с соломой /

Fig. 1. Dynamics of cellulase activity of isolates *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2, *S. antimycoticus* 8A13 in monocultures and in binary association on a medium with straw

В литературе ранее уже отмечалось повышение до двух раз целлюлазной активности *Streptomyces ambofaciens* OZ2 при совместном культивировании с *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 [17]. Также сообщалось о положительных эффектах при совместном культивировании стрептомицетов с грибом *Aspergillus niger*: активность β -глюкозидазы в бинарных культурах была в 3,0-3,5 раза выше по сравнению с монокультурой гриба [18]. Однако данные по стимулирующему влиянию на активность целлюлазы совместного культивирования двух разных видов стрептомицетов в доступной нам литературе ранее не встречались.

В другой бинарной культуре целлюлазная активность при совместном культивировании изолята *S. thermocarboxydus* 1.3 с антагонистически активным штаммом *S. antimycoticus* 8А13 сохранялась на том же уровне, что и в монокультуре (около 6000 ед./10 мин /г). Пик активности штамма 1.3 пришелся на вторые сутки, тогда как в бинарной культуре на основе этих штаммов максимум активности наблюдали уже в первые сутки, но при этом активность сохранялась дольше: к третьим суткам целлю-

лазная активность составила 2587 ед./10 мин /г, активность фермента в монокультуре *S. thermocarboxydus* 1.3 к этому времени снизилась до нуля (рис. 2).

Не отмечено существенного повышения целлюлазной активности и в третьей бинарной ассоциации, полученной на основе штаммов *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 и *Streptomyces* sp. Н 27-25. Целлюлазная активность в этом случае была на треть ниже, чем у штамма *Streptomyces* sp. Н 27-25 (10130 ед./10 мин /г) в монокультуре. Однако совместное культивирование изолятов оказало пролонгирующий эффект, в результате которого целлюлазная активность в данной бинарной культуре через 72 часа в 2,3 раза превышала активность фермента в монокультуре *Streptomyces* sp. Н 27-25 (рис. 3).

Антифитопатогенное действие. Оценка антимикробного действия испытуемых изолятов в отношении бактериальных и грибных фитопатогенов проведена путем регистрации величины зон угнетения их роста в чистых культурах на чашках Петри. Совокупность полученных данных визуализирована в виде тепловых карт, на которых отражены различия

по величине зон ингибирования различных тест-культур (строки) между монокультурами стрептомицетов и полученными на их основе бинарными культурами, в сравнении с ком-

мерческими препаратами – антибиотиками (столбцы). Величина зон ингибирования изменялась от 0 до 25 мм, что отображено на картах цветовым переходом.

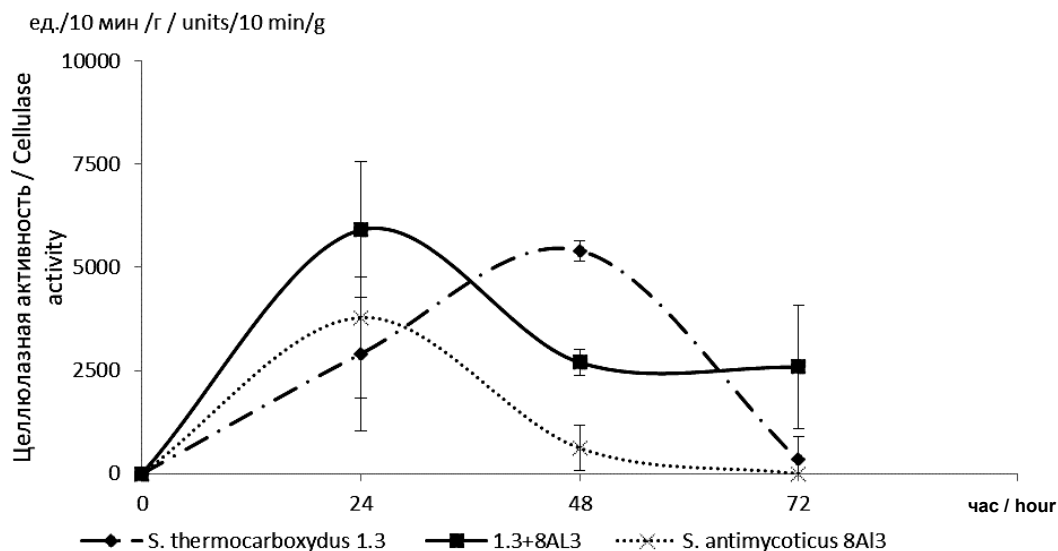


Рис. 2. Изменение целлюлазной активности *S. thermocarboxydus* 1.3, *S. antimycoticus* 8A13 в монокультурах и бинарной ассоциации на среде с соломой /

Fig. 2. Changes in cellulase activity of *S. thermocarboxydus* 1.3, *S. antimycoticus* 8A13 in monocultures and in binary association on a medium with straw

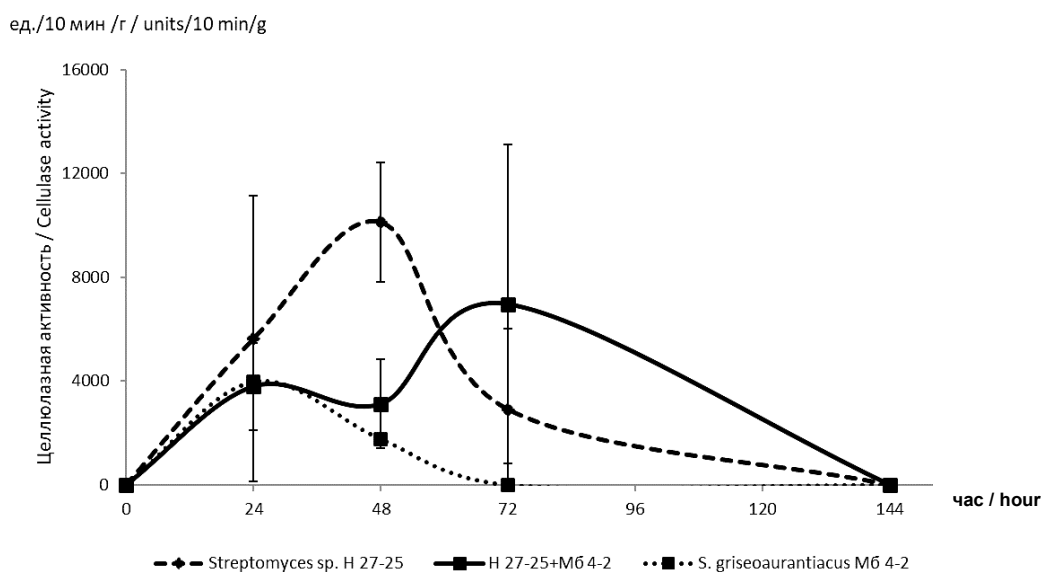


Рис. 3. Изменение целлюлазной активности *Streptomyces* sp. H 27-25 и *S. griseoaurantiacus* M6 4-2 в монокультурах и бинарной ассоциации на среде с соломой /

Fig. 3. Changes in cellulase activity of *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 and *Streptomyces* sp. H 27-25 in monocultures and in binary association on a medium with straw

При построении тепловой карты все сравниваемые культуры были разделены автоматизированным алгоритмом в отношении тест-бактерий на три кластера (рис. 4). Первый кластер представлен для сравнения препаратом канамицин, который проявил активность

в отношении 4 тест-бактерий, образуя зоны ингибирования диаметром до 25 мм. Все испытуемые штаммы как в монокультурах, так и бинарных культурах достоверно ($P \geq 0,95$) уступали канамицину по своему антибактериальному действию. Более других было

приближено к действию канамицина ингибирующее действие монокультур *S. antimycoticus* 8A13, *Streptomyces* sp. Н 27-25 и бинарной культуры *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, образовавших второй кластер. Спектр их антагонистической активности тоже включал 4 тест-культуры, а зоны ингибирования не превышали 16 мм. Третий кластер

объединил штаммы-целлюлолитики *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, *S. thermocarboxydus* 1.3 и их бинарные культуры со штаммом *S. antimycoticus* 8A13. Вошедшие в третий кластер культуры стрептомицетов угнетали рост всего 1-2 тест-бактерий, а зоны ингибирования варьировали от 10 до 15 мм.

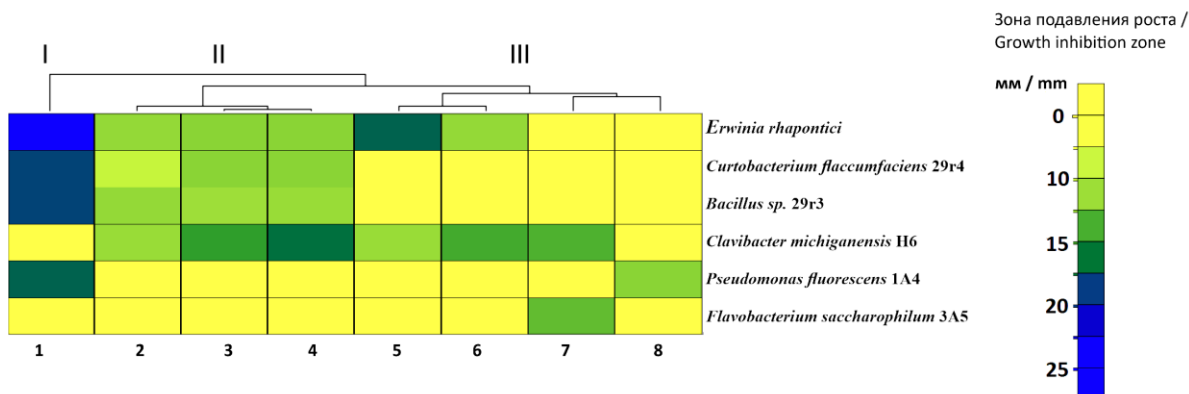


Рис. 4. Тепловая карта, отражающая различия в величине зон ингибирования бактериальных тест-культур изолятами стрептомицетов по отдельности и в бинарных культурах: 1 – канамицин, 2 – *S. antimycoticus* 8A13, 3 – *Streptomyces* sp. Н 27-25, 4 – *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, 5 – *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. thermocarboxydus* 1.3, 6 – *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13, 7 – *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, 8 – *S. thermocarboxydus* 1.3 /

Fig. 4. Heat map reflecting differences in the size of inhibition zones of bacterial test cultures by streptomycete isolates individually and in binary cultures: 1 – kanamycin, 2 – *S. antimycoticus* 8A13, 3 – *Streptomyces* sp. Н 27-25, 4 – *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2, 5 – *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. thermocarboxydus* 1.3, 6 – *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13, 7 – *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2, 8 – *S. thermocarboxydus* 1.3

Из литературы известно, что совместное культивирование стрептомицетов уменьшает антагонизм штаммов по отношению к бактериям [8]. Авторы считают, что это особенность может быть полезна при создании более сложных ассоциаций, в которые, наряду со стрептомицетами, входили бы и другие, например, пробиотические бактерии. По мнению других авторов, совместное культивирование нескольких штаммов микроорганизмов, напротив, может способствовать индукции антагонистической активности в отношении бактерий [19].

Гораздо более выраженным было угнетающее действие совместно культивируемых стрептомицетов в отношении фитопатогенных грибов. Средняя величина зон ингибирования ($18,76 \pm 6,1$ мм) роста тест-культур ассоциацией *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. thermocarboxydus* 1.3 была сопоставима с таковыми у препарата сравнения – коммерческого антимикотика тербинафина ($19,8 \pm 6,2$ мм). При кластеризации автоматизированным алгоритмом она была объединена в один кластер с тербинафином (рис. 5). Эта бинарная ассоциация подавляла рост всех семи тест-культур грибов,

диаметр зон ингибирования в среднем составил $18,7 \pm 6,1$ мм, что существенно превосходит антифунгальный эффект монокультуры *S. antimycoticus* 8A13 ($11,09 \pm 6,39$ мм), который уже проявил себя в предыдущих исследованиях как перспективный биофунгицид [15]. Примечательно, что оба члена второго кластера были включены в эксперимент как целлюлолитики. Но при совместном культивировании с одним из них (*S. griseoaurantiacus* Мб 4-2) антифунгальное действие штаммов-антагонистов 8A13 и Н 27-25 увеличивалось, а с другим (*S. thermocarboxydus* 1.3), наоборот, снижалось.

Штаммы *S. antimycoticus* 8A13, *Streptomyces* sp. Н 27-25 и бинарные культуры *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13 составили третий кластер на тепловой карте, отражающей различия в ингибировании стрептомицетами грибных фитопатогенов (рис. 5). Спектр их антифунгальной активности включал от 3 до 5 тест-грибов, а зоны ингибирования изменялись от 10 до 22 мм. В третий кластер вошли штаммы *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 и *S. thermocarboxydus* 1.3, не проявившие в монокультурах антифунгального действия.

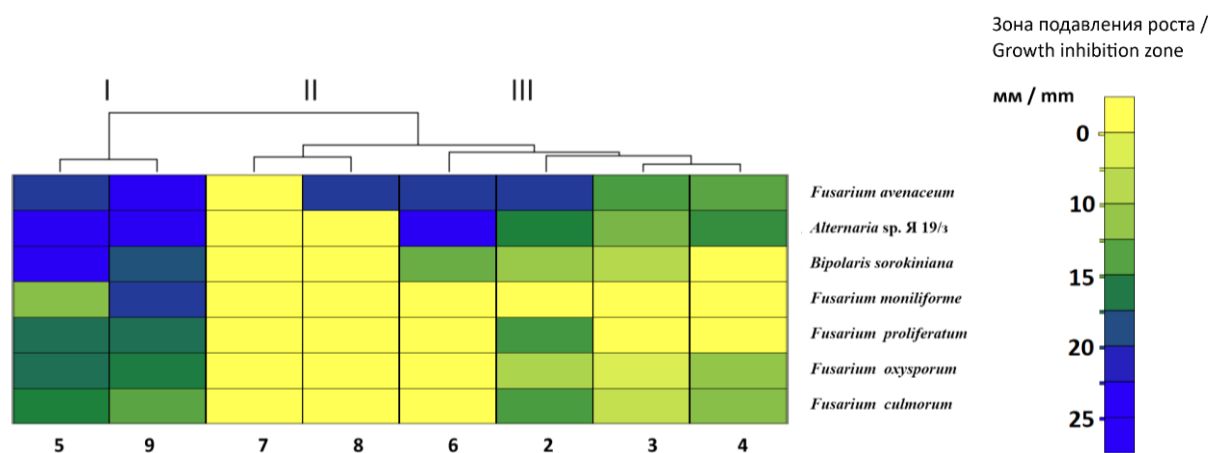


Рис. 5. Тепловая карта, отражающая различия в величине зон ингибирования грибных тест-культур изолятами стрептомицетов по отдельности и в бинарных культурах: 2 – *S. antimycoticus* 8A13, 3 – *Streptomyces* sp. Н 27-25, 4 – *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, 5 – *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. thermocarboxydus* 1.3, 6 – *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13, 7 – *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2, 8 – *S. thermocarboxydus* 1.3, 9 – тербинафин /

Fig. 5. Heat map reflecting differences in the size of inhibition zones of fungal test cultures by streptomycete isolates individually and in binary cultures: 2 – *S. antimycoticus* 8A13, 3 – *Streptomyces* sp. Н 27-25, 4 – *Streptomyces* sp. Н 27-25 + *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2, 5 – *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 + *S. thermocarboxydus* 1.3, 6 – *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13, 7 – *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2, 8 – *S. thermocarboxydus* 1.3, 9 – terbinafine

В литературе сообщалось о стимуляции антагонистической активности стрептомицетов по отношению к грибным фитопатогенам при совместном культивировании [7], такой же эффект наблюдался при совместном культивировании бактерий и грибов [20]. Возможно, это связано с тем, что совместное культивирование, до некоторой степени, имитирует рост и конкурентные условия природной среды [7], и может тем самым приводить к активации некоторых «спящих» генов [3].

Фиторегуляторное действие. Оценивая пригодность стрептомицетов к применению в составе почвоулучшающего препарата, необходима уверенность в отсутствии у кандидатных штаммов токсического действия на растения, так как представители рода *Streptomyces* могут производить вторичные метаболиты, подавляющие рост растений [21, 22]. Фиторегуляторное влияние испытываемых культур оценивали на проростках пшеницы мягкой. Действие монокультур и составленных на их основе бинарных ассоциаций на всхожесть семян, линейные размеры и сухую биомассу проростков в возрасте 6 суток сравнивали с контрольным вариантом, в котором для обработки использовали воду, поскольку существенной разницы между результатами замачивания семян в воде и питательной среде не выявлено. Если по отдельности ЖК *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 и *S. antimycoticus* 8A13

в разведении 10^{-1} стимулировали всхожесть и накопление сухой биомассы проростками, то при сокультивировании обработка семян этими же штаммами, напротив, способствовала снижению всех морфометрических показателей по сравнению с контролем. Но ингибирующее действие бинарной культуры значительно ослаблялось или устранялось при разведении ЖК до 10^{-2} (табл. 2).

Введение штамма 8A13 в состав другой бинарной культуры *S. thermocarboxydus* 1.3 + *S. antimycoticus* 8A13, напротив, нивелировало отрицательное влияние на проростки штамма-целлюлолитика 1.3, проявившееся в монокультуре в отношении морфометрических показателей проростков пшеницы в результате обработки ЖК в разведении 10^{-1} , но устраненное при разведении ЖК до 10^{-2} . Аналогичный синергетический эффект, только менее выраженный, наблюдали и в результате обработки семян третьей бинарной культурой *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *Streptomyces* sp. Н 27-25. В ассоциации с антагонистом Н 27-25 штамма-целлюлолитик Мб 4-2 отчасти компенсировал его ингибирующее влияние в разведении 10^{-1} на всхожесть, высоту ростка и сухую биомассу пшеницы. На длину корня данная бинарная культура оказала положительное регуляторное действие в разведении 10^{-2} .

Таблица 2 – Всхожесть и морфометрические показатели проростков пшеницы при обработке семян ЖК стрептомицетов /

Table 2 – Germination and morphometric parameters of wheat seedlings

Вариант / Variant	Всхожесть / Germination	Высота ростка / Sprout height	Длина корня / Root length	Биомасса / Biomass
<i>S. griseoaurantiacus</i> Мб 4-2 + <i>S. antimycoticus</i> 8А13				
Контроль / Control	66,0±12,4 %	70,5±5,9 мм	140,4±9,2 мм	0,233±0,038 г
Мб 4-2 + 8А13, % от К	<u>80,7</u> 96,5	<u>79,8</u> 81,7	<u>84</u> 91,7	<u>79,5</u> 106,3
Мб 4-2, % от К	<u>128,1*</u> 103,5	<u>107,8</u> 107,8	<u>100</u> 93,8	<u>136,6*</u> 103,9
8А13, % от К	<u>141,5*</u> 114,6	<u>107,2</u> 95,57	<u>100</u> 98,4	<u>141,5*</u> 114,6
<i>S. thermocarboxydus</i> 1.3 + <i>S. antimycoticus</i> 8А13				
Контроль / Control	96,0±3,3 %	54,4±5,7 мм	105,7±3,9 мм	0,34±0,02 г
1.3 + 8А13, % от К	<u>102,1</u> 95,8	<u>119,20</u> 106,44	<u>104,73</u> 106,9	<u>106,8</u> 101,5
8А13, % от К	<u>141,5*</u> 114,6	<u>107,2</u> 95,6	<u>100</u> 98,4	<u>141,5*</u> 114,6
1.3, % от К	<u>102,1</u> 99,0	<u>78,78</u> 122,7	<u>88,50</u> 105,5	<u>85,29</u> 108,8
<i>S. griseoaurantiacus</i> Мб 4-2 + <i>Streptomyces</i> sp. Н 27-25				
Контроль / Control	94,0±5,2 %	62,46±7,9 мм	106,6±5,1 мм	0,375±0,03 г
Мб 4-2 + Н 27-25, % от К	<u>102,0</u> 101,1	<u>100</u> 98,9	<u>92,7</u> 105,0	<u>86,6</u> 90,6
Мб 4-2, % от К	<u>128,1*</u> 103,5	<u>107,8</u> 107,8	<u>100</u> 93,8	<u>136,6*</u> 103,9
Н27-25, % от К	<u>77,3</u> 97,3	<u>86,4</u> 96,2	<u>97,8</u> 94,7	<u>77,3</u> 97,3

Примечания: в числителе приведены значения показателей при обработке семян ЖК в разведении 10^{-1} , в знаменателе – в разведении 10^{-2} , * отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля (К) – обработки водой, $P \geq 0,95$ /

Notes: above the line are the values of indicators when treating seeds with LC at a dilution of 10^{-1} , below the line – at a dilution of 10^{-2} , * values that are statistically significantly different from the control are marked, $P \geq 0.95$

Таким образом, оценка фиторегуляторной способности природных изолятов и полученных на их основе бинарных ассоциаций не выявила существенного влияния ЖК стрептомицетов на рост и развитие пшеницы мягкой на раннем этапе онтогенеза, что позволяет говорить об отсутствии у данных штаммов фитотоксического эффекта. Наблюдавшееся в отдельных случаях снижение всхожести и отдельных морфометрических показателей может быть устранено путем подбора оптимального разведения ЖК.

Заклучение. В ходе работы показано, что совместное культивирование штаммов рода *Streptomyces* может синергетически влиять на уровень целлюлазной и антагонистической активности по отношению к грибным фитопатогенам.

Бинарная культура *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 + *S. antimycoticus* 8А13 проявила более высокую целлюлолитическую и антифунгаль-

ную активность в отношении фитопатогенов, чем входящие в нее штаммы по отдельности. Отсутствие выраженного фитотоксического эффекта позволяет безопасно использовать ее для интродукции в почву и обработки растений. Низкий уровень антагонизма бинарной культуры по отношению к другим бактериям обеспечивает возможность дальнейшей работы с ассоциацией и введения в нее способствующих росту растений PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) бактерий. Очевидно, что разработка биопрепарата на основе нескольких штаммов стрептомицетов и бактерий, обладающих синергическим действием, – сложный процесс, требующий дальнейших исследований. Однако полученные при тестировании трех бинарных культур результаты вселяют оптимизм и говорят о перспективности получения искусственных ассоциаций стрептомицетов для использования в агротехнологиях.

References

1. Yang J., Hsiang T., Bhadauria V., Xiao-Lin C., Guotian L. Plant Fungal Pathogenesis. *BioMed Research International*. 2017;(2017):1-2. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9724283>
2. Yu Z., Han C., Yu B., Zhao J., Yan Y., Huang S., Liu C., Xiang W. Taxonomic Characterization, and Secondary Metabolite Analysis of *Streptomyces triticiradicis* sp. nov.: A Novel Actinomycete with Antifungal Activity. *Microorganisms*. 2020;8(1):77. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010077>
3. Maglangit F., Fang Q., Kyeremeh K., Sternberg J. M., Ebel R., Deng H. A Co-Culturing Approach Enables Discovery and Biosynthesis of a Bioactive Indole Alkaloid Metabolite. *Molecules*. 2020;25(2):256. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25020256>
4. Dong L., Bian X., Zhao Y., Yang H., Xu Y., Han Y., Zhang L. Rhizosphere analysis of field-grown Panax ginseng with different degrees of red skin provides the basis for preventing red skin syndrome. *BMC Microbiology*. 2022;22:12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02430-9>
5. Fang X., Wang H., Zhao L., Wang M., Sun M. Diversity and structure of the rhizosphere microbial communities of wild and cultivated ginseng. *BMC Microbiology*. 2022;22:2. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02421-w>
6. Priyanka J. V., Rajalakshmi S., Senthil Kumar P., Krishnaswamy V. G., Al Farraj D. A., Elshikh M. S., Gawwad M. R. A. Bioremediation of soil contaminated with toxic mixed reactive azo dyes by co-cultured cells of *Enterobacter cloacae* and *Bacillus subtilis*. *Environmental Research*. 2022;204(Part B):112136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112136>
7. Li J., Zhang L., Yao G., Zhu L., Lin J., Wang C., Du B., Ding Y., Mei X. Synergistic effect of co-culture rhizosphere *Streptomyces*: A promising strategy to enhance antimicrobial activity and plant growth-promoting function. *Front Microbiol*. 2022;13:976484. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976484>
8. Park H. B., Park J. S., Lee S. I., Shin B., Oh D. C., Kwon H. C. Gordonic Acid, a Polyketide Glycoside Derived from Bacterial Coculture of *Streptomyces* and *Gordonia Species*. *Journal of Natural Products*. 2017;80(9):2542-2546. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00293>
9. Sinjaroonsak S., Chaiyaso T., H-Kittikun A. Optimization of Cellulase and Xylanase Productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W Using Low Cost Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019;189(1):76-86. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02986-3>
10. Celaya-Herrera S., Casados-Vázquez L. E., Valdez-Vázquez I., Barona-Gómez F., Bideshi D. K., Barboza-Corona J. E. A Cellulolytic *Streptomyces* Sp. Isolated from a Highly Oligotrophic Niche Shows Potential for Hydrolyzing Agricultural Wastes. *BioEnergy Research*. 2021;14(5):333-343. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>
11. Baltz R. H. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2016;43(2-3):343-370. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1682-x>
12. Makitrynsky R., Tsyplik O., Bechthold A. Genetic Engineering of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 for Improved Production of Moenomycins. *Microorganisms*. 2022;10(1):30. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010030>
13. Боков Н. А., Назарова Я. И., Широких И. Г. Изменение целлюлазной активности стрептомицетов в зависимости от продолжительности культивирования. Экология родного края: проблемы и пути их решения: мат-лы XVII Всеросс. научн.-практ. конф. с междунар. участием. Киров: Вятский государственный университет, 2022. С. 15-19. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49235975> EDN: NUSQPC
14. Bokov N. A., Nazarova Ya. I., Shirokikh I. G. Changes in cellulase activity of streptomycetes depending on the duration of cultivation. Ecology of the native land: problems and ways to solve them: Proceedings of the XVII All-Russian scientific-practical conf. with international participation. Киров: *Vyatskiy gosudarstvennyy universitet*, 2022. pp. 15-19. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49235975>
15. Боков Н. А., Широких И. Г. Оценка фиторегуляторной активности стрептомицетов-целлюлозолитиков. Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: мат-лы XX Всеросс. научн.-практ. конф. с междунар. участием. Киров: Вятский государственный университет, 2022. С. 203-207. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49950177> EDN: SVQIHV
16. Bokov N. A., Shirokikh I. G. Assessment of phyto regulatory activity of cellulolytic streptomycetes. Biodiagnosics of the state of natural and natural-technogenic systems: Proceedings of the XX All-Russian scientific and practical conference with international participation. Киров: *Vyatskiy gosudarstvennyy universitet*, 2022. pp. 203-207. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49950177>
17. Широких И. Г., Назарова Я. И., Бакулина А. В., Абубакирова Р. И. Новые штаммы стрептомицетов как перспективные биофунгициды. Теоретическая и прикладная экология. 2021;(1):172-180. DOI: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180> EDN: SUHXUY
18. Shirokikh I. G., Nazarova Ya. I., Bakulina A. V., Abubakirova R. I. New streptomycetes strains as promising biofungicides. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* = Theoretical and Applied Ecology. 2021;(1):172-180. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180>

16. Ryan M. C., Stucky M., Wakefield C., Melott J. M., Akbani R., Weinstein J. N., Broom B. M. Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps. *F1000Research*. 2019;(8):1750. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>
17. Baltaci M. O. Enhancement of cellulase production by co-culture of *Streptomyces ambofaciens* OZ2 and *Cytobacillus oceanisediminis* OZ5 isolated from rumen samples. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2022;40(2):144-152. DOI: <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2038581>
18. Detain J., Rémond C., Rodrigues C. M., Harakat D., Besaury L. Co-elicitation of lignocellulolytic enzymatic activities and metabolites production in an *Aspergillus-Streptomyces* co-culture during lignocellulose fractionation. *Current Research in Microbial Sciences*. 2022;3:100108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100108>
19. Ueda K., Beppu T. Antibiotics in microbial coculture. *The Journal of Antibiotics*. 2017;(70):361-365. DOI: <https://doi.org/10.1038/ja.2016.127>
20. Octarya Z., Nugroho T. T., Nurulita Y., Suraya N., Saryono. Production of antifungal compounds from *Bacillus paramycoides* LBKURCC218 and *Aspergillus fumigatus* LBKURCC269 co-cultivation. *Materials Today: Proceedings*. 2023;87(2):120-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.02.382>
21. Широких И. Г., Комлева А. В. Выделение и характеристика нового штамма стрептомицета-продуцента боррелидина. Экология родного края: проблемы и пути их решения: мат-лы XVII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Т. Кн. 2. Киров: Вятский государственный университет, 2022. С. 10-15. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49235974> EDN: DVXSFB
- Shirokikh I. G., Komleva A. V. Isolation and characteristics of a new borrelidin-producing streptomycete strain. Ecology of the native land: problems and ways to solve them: Proceedings of the XVII All-Russian. scientific-practical conf. with international Participation. Т. Book 2. Kirov: *Vyatskiy gosudarstvennyy universitet*, 2022. pp. 10-15. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=49235974>
22. Куликова Н. А. Получение и масштабы применения гербицидов: история и современные тенденции. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2020;(2):52-68. DOI: <https://doi.org/10.26178/AE.2020.2019.4.016> EDN: IUESEN
- Kulikova N. A. Herbicides synthesis and usage: history and current trends. *Problemy agrokhimii i ekologii*. 2020;(2):52-68. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.26178/AE.2020.2019.4.016>

Сведения об авторах

✉ **Боков Никита Александрович**, аспирант, младший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», ул. Ленина 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-1192>, e-mail: nikita-bokov@mail.ru

Абубакирова Роза Ильдусовна, лаборант-исследователь, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», ул. Ленина 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8526-2733>

Широких Ирина Геннадьевна, доктор биол. наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», д. 166а, ул. Ленина, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3319-2729>

Information about the authors

✉ **Nikita A. Bokov**, graduate student, junior researcher, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-1192>, e-mail: nikita-bokov@mail.ru

Roza I. Abubakirova, laboratory researcher, Federal State Budgetary Institution Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8526-2733>

Irina G. Shirokikh, DSc in Biological Science, chief researcher, Head of the Laboratory, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, email: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3319-2729>

✉ – Для контактов / Corresponding author