

УДК 631.46-576.8

АКТИНОМИЦЕТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НИЗИННЫХ ТОРФЯНИКОВ

© 2022 г. А. В. Головченко^{а, *}, Т. А. Грачева^а, В. А. Лыпкань^а,
Т. Г. Добровольская^а, Н. А. Манучарова^а^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия*e-mail: golovchenko.alla@gmail.com

Поступила в редакцию 17.12.2021 г.

После доработки 11.02.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2022 г.

Изучены актиномицетные комплексы низинных торфяников различного генезиса: озерного, лесного и пойменного заболачивания (Тверская и Томская области, Россия). Образцы из торфяников (мощностью 3 м) отбирали послойно с учетом ботанического состава торфов в конце сентября 2019 г. Длину и биомассу актиномицетного мицелия определяли люминесцентно-микроскопическим методом, численность культивируемых актиномицетов — чашечным методом. Видовую идентификацию актиномицетов проводили на основании морфологических, культуральных признаков и анализа фрагментов 16S рРНК. Антагонистическую активность стрептомицетов исследовали методом агаровых блоков. Актиномицетный мицелий обнаруживали по всему профилю торфяников, его длина варьировала от 700 до 3000 м/г, биомасса — от 22 до 140 мкг/г сухого торфа. Впервые выявлена достоверная зависимость содержания актиномицетного мицелия от ботанического состава и степени разложения торфов, слагающих профили исследуемых торфяников. Актиномицеты были представлены родами: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium*. Доминирующие по частоте встречаемости представители рода *Streptomyces* были отнесены к 19 видам из 9 серий и 5 секций. У 70% актиномицетов обнаружена способность к микроаэрофильному росту, что свидетельствует об их адаптации к дефициту кислорода, существующему в глубоких слоях торфяников. Антибактериальной активностью обладали 89% изолятов. Наиболее активными оказались штаммы *S. avicenniae* и *S. caeruleus*. Они характеризовались множественной резистентностью к антибиотикам.

Ключевые слова: торфяные эутрофные почвы, Sapric Histosols, актиномицетный мицелий, культивируемые актиномицеты, микроаэрофильный рост, антибактериальная активность, антибиотическая активность

DOI: 10.31857/S0032180X22080020

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что анализ микробных сообществ болот проводится уже более полувека, остается много вопросов, на которые еще предстоит ответить микробиологам. Главные из них — какие группы и таксоны бактерий, актиномицетов, грибов преобладают в торфяниках разного генезиса, какие экологические функции они осуществляют в специфической среде обитания, какой является торф.

Следует отметить, что микробиологический аспект изучения торфяных почв становится актуальным, так как подразделение на типы по трофности лучше всего осуществляется по их биологическим свойствам. Многие используемые агрохимические параметры (NPK, степень насыщенности основаниями и др.) показали свою относительную неэффективность при диагностике органогенных почв [1].

В настоящей работе основное внимание будет уделено актиномицетным комплексам низинных

торфяников. Деятельность актиномицетов активируется с усилением процессов разложения органического вещества [18]. Низинный торф в отличие от верхового характеризуется высокой степенью минерализации органического вещества и является благоприятным субстратом для актиномицетов, которые способны разлагать сложные полимеры, накапливающиеся на поздних стадиях разложения органического вещества. В низинных торфяниках выявляют высокую численность актиномицетов, которая на 2–3 порядка больше, чем в верховых торфяниках [7, 12, 13].

Состояние органического вещества болот разного генезиса определяет различия не только в показателях обилия, но и в структурно-функциональной организации актиномицетных комплексов. Данные относительно численности и таксономического состава актиномицетных комплексов, их профильного распределения и биомассы в низинных торфяниках немногочисленны, противоречивы и требуют дополнительной проработки.

Таблица 1. Ботанический состав, степень разложения (СРТ), рН_{водн}, С/Н низинных торфов, слагающих профиль исследуемых торфяников

Глубина, см	Торфяник 1			Торфяник 2			Торфяник 3		
	ботанический состав (СРТ, %)	рН _{водн}	С/Н	ботанический состав (СРТ, %)	рН _{водн}	С/Н	ботанический состав (СРТ, %)	рН _{водн}	С/Н
0–20	Древесно-осоковый (36)	6.4	22	Травяной (25)	4.4	40	Осоковый (25–27)	6.1	17
20–50	Древесный (35–40)	6.5	23	Осоковый (35)	4.7	23		6.0	15
50–75		6.6	24	Травяной (30)	4.9	21		5.7	26
75–100		6.7	24		5.4	21		5.7	20
100–150		6.7	21	Вахтовый (25)	5.6	23		7.2	22
150–200		6.6	21	Травяно-гипновый (20–25)	6.5	18		Осоково-гипновый (35–40)	7.2
200–250	6.7	21	7.3		17	7.3	23		
250–300	Древесно-осоковый (42)	6.8	39		7.4	20	Древесный (45)	7.3	22

Кроме того, в связи с мировой тенденцией неуклонно растущей резистентности к существующим антибиотикам, актуальным остается поиск актинобактерий, способных продуцировать новые виды антибиотиков для создания противомикробных препаратов.

Антагонистические штаммы актиномицетов, выделенные из почв, являются ценными инструментами для экологически чистой, здоровой и безопасной борьбы с фитопатогенными микроорганизмами. Многие исследователи отмечают значительный вклад актиномицетов в формирование почвенного резиста [25, 28, 33].

Цель работы – изучение актиномицетных комплексов низинных торфяников различного генезиса для расширения знаний о биоразнообразии болотных экосистем и выявления культур актиномицетов с высоким антагонистическим потенциалом.

Данное исследование является частью комплексной работы по изучению микробных сообществ низинных торфяников России [4–6, 8, 9, 31].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были низинные торфяники различного генезиса, которые классифицированы как эутрофные торфяные мощные почвы [24], по WRB – Sapric Histosols [23].

Низинный торфяник 1 (56°09'55" N; 32°08'13" E) под сосняком болотно-травяным – пример торфяника озерного происхождения. Он является частью болотного массива “Петушиха” (Тверская область). Залежь этого торфяника сложена низинными торфами: древесно-осоковым и древесным со степенью разложения 35–42%, подстилается смешанно-водорослевым сапропелем. Значения рН_{водн} по всему профилю близки к нейтральным. Отношение С/Н в большей части профиля составляет 21–24 (табл. 1).

Низинный торфяник 2 под березняком сосново-сфагновым (56°23'25" N; 84°38'47" E) – пример торфяника лесного заболачивания. Он является частью болотного массива “Клюквенное” (Томская область). Его толща сложена преимущественно среднеразложившимися торфами (степень разложения 21–23%) травяной группы и подстилается суглинками. Значение рН_{водн} увеличивается с глубиной от 4.4 до 7.4. Отношение С/Н в большей части профиля составляет 17–23.

Низинный торфяник 3 (56°31'09" N; 84°38'27" E) является частью болотного массива “Карбышевское” (Томская область). Это пример торфяника пойменного заболачивания. Река Порос, протекающая по болоту, является левобережным притоком р. Томи. Современные аллювиальные отложения поймы представлены суглинками. Болотный массив почти полностью покрыт смешанным лесом. Древесный ярус состоит из ели, кедра, сосны, березы, пихты, полнота древостоя 0.6–0.7. Кустарничковый ярус (брусника, костяника) угнетен. Травяной ярус, представленный преимущественно осоками, хвощами, папоротниками и вахтой, покрывает 40–50% поверхности. Моховой ярус развит фрагментарно, и в основном это зеленые мхи. Торфяная залежь представлена низинными торфами древесной, травяной и травяно-моховой групп. Степень разложения торфов увеличивается вниз по профилю от 25 до 45%. Карбонатность подстилающих пород определяет смену рН_{водн} по профилю – от слабокислой реакции в верхней 1.5 м толще до нейтральной и слабощелочной в слое 1.5–3 м. Отношение С/Н варьирует по профилю от 15 до 26.

Максимальное опускание грунтовых вод во время летнего высыхания в исследуемых торфяниках не превышало 50 см, соответственно мощность деятельного слоя в них составила 50 см, инертного – 250 см.

На исследуемых болотных массивах в третьей декаде сентября 2019 г. торфяным буром пробурили колонки (по три для каждого объекта) для отбора проб и их дальнейшего анализа. Отбирали смешанные послойные образцы с глубин 0–20, 20–50, 50–100, 100–150, 150–200, 200–250 и 250–300 см, соблюдая стерильность. Образцы доставляли до места исследования в переносных сумках-холодильниках.

Длину актиномицетного мицелия определяли прямым люминесцентно-микроскопическим методом [22]. Для приготовления торфяной суспензии отбирали 1 г торфа и помещали в колбу со 100 мл стерильной воды. Полученную суспензию обрабатывали на ультразвуковом диспергаторе Bandelin Sonopuls HD 2070 (Germany) в течение 2 мин при мощности 50% для десорбции мицелия с торфяных частиц. Для одного образца на двух обезжиренных предметных стеклах готовили 6 препаратов. На каждый препарат наносили микропипеткой 0.01 мл суспензии и равномерно распределяли на площади 4 см². Затем препараты высушивали на воздухе, фиксировали над пламенем горелки, окрашивали водным раствором акридина оранжевого и просматривали в 50 полях зрения на люминесцентном микроскопе “Люмам-ИЗ” (Россия).

Длину актиномицетного мицелия в 1 г торфа (N) рассчитывали по формуле:

$$N = S_1 a n / (v S_2 c) \times 10^6$$
, где S_1 – площадь препарата, мкм²; a – средняя длина обрывков актиномицетного мицелия в поле зрения, мкм; n – показатель разведения суспензии, мл; v – объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 – площадь поля зрения микроскопа, мкм²; c – навеска торфа, г. Пересчитывали полученные данные на 1 г сухого торфа. Для определения влажности образцы торфа высушивали при 105°C в течение 6 ч.

Биомассу актиномицетного мицелия (B) рассчитывали по формуле: $B = N 3.9 \times 10^{-5}$ (г), где N – длина актиномицетного мицелия в 1 г сухого торфа, а 3.9×10^{-5} г – биомасса 1 м актиномицетного мицелия с диаметром 0.5 мкм [19].

Численность культивируемых актиномицетов определяли методом поверхностного посева из серии разведений на агаризованную среду Гаузе I [3] в пятикратной повторности. Для посева использовали ту же суспензию, что и для приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии. Чашки с посевами инкубировали в термостате при 28°C в течение 7–10 сут, затем подсчитывали колонии актиномицетов. Данные по общей численности актиномицетов выражали в колониеобразующих единицах (**КОЕ**) на 1 г сухого торфа.

Определение таксономического статуса актиномицетов начинали с учета их культурально-диагностических признаков, затем оценивали под биноклем при малом увеличении их морфо-

логические признаки. Идентификацию актиномицетов рода *Streptomyces* проводили на ряде диагностических сред (Гаузе I, Гаузе II, овсяном, глицерин-нитратном и пептонно-дрожжевом агаре), рецепты которых приведены в определителе актиномицетов [3]. Для уточнения видовой принадлежности штаммов стрептомицетов с высоким антагонистическим потенциалом анализировали фрагменты 16S рРНК в НПК “Синтол” (Москва).

Для родов актиномицетов рассчитывали частоту встречаемости – отношение числа образцов, в которых присутствовал данный род, к общему числу проанализированных образцов.

Способность роста актиномицетов в микроаэрофильных условиях тестировали методом посева уколом в агаровый столбик (высотой 7 см) овсяного агара. Пробирки с культурами актиномицетов инкубировали 7 дней в термостате при температуре 28°C, затем оценивали способность культур к росту на поверхности или в столбике агара [35].

Антагонистическую активность актиномицетов определяли методом агаровых блоков [20]. В качестве тест-культур использовали бактериальные штаммы, выделенные из профилей низинных и верховых торфяников, а также из подстилок лесных болот.

Для определения резистентности выделенных штаммов актиномицетов использовали бумажные диски с антибиотиками: тетрациклином, гентамицином, левомицетином, канамицином в концентрации 100 мкг/мл.

Виды низинного торфа, степень их разложения, рН_{водн} определяли по ГОСТ 28245.2-89 и 11306-83 в Научно-исследовательском институте биологии и биофизики при Томском государственном университете. Содержание углерода и азота в различных слоях исследуемых торфяников выявляли с помощью CHNS-анализатора Vario EL III (Elementar, Германия) в токе кислорода при 1150°C.

Обработку массивов данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0 и Microsoft Excel 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диапазон колебаний длины актиномицетного мицелия в исследуемых торфяниках – от 700 м/г до 3 км/г сухого торфа. В низинных торфяниках других регионов России порядок величин, характеризующих этот показатель обилия [4, 7, 9, 10], близок к установленному в этом исследовании.

Актиномицетный мицелий обнаруживали по всему профилю исследуемых торфяников. Различным оказался характер его профилевого распределения. В торфянике I озерного заболачивания длина актиномицетного мицелия сохранялась на высоком уровне (1.5–2.2 км/г торфа) в

пределах верхней метровой толщи, далее она уменьшалась в 2 раза в слое 100–150 см и поддерживалась на уровне 0.7–1 км/г торфа в оставшейся части профиля. В торфянике 2 лесного заболачивания длина актиномицетного мицелия флуктуировала по профилю. Однако наибольшие значения выявлены в верхнем метровом слое этого торфяника. Для торфяника 3 пойменного заболачивания установлено преимущественно плавное уменьшение длины актиномицетного мицелия по профилю, кроме слоя 1.5–2 м, в котором обилие актиномицетов возрастало до уровня, установленного в слое 25–50 см (рис. 1). Варианты профильного распределения актиномицетного мицелия, выявленные в данном исследовании, встречались в низинных торфяниках других регионов. Плавное уменьшение содержания актиномицетного мицелия с глубиной отмечали в работах [8, 9]; флуктуирование по профилю и наличие пиков в глубоких слоях – в [4, 10].

Различным в торфяниках оказался не только характер профильного распределения актиномицетного мицелия, но и амплитуда его значений. Она была максимальной в торфянике 2 лесного заболачивания. Практически на всех глубинах этого торфяника обилие актиномицетного мицелия было больше, чем в других торфяниках.

Достоверность выявленных различий подтверждена результатами двухфакторного дисперсионного анализа, где рассматриваемыми факторами были “исследуемый торфяник” и “глубина отбора образцов”. Влияние обоих факторов на длину актиномицетного мицелия оказалось достоверным, но максимальным по силе влияния был фактор “исследуемый торфяник” – 63% от общей дисперсии (табл. 2).

Характер заболачивания, различный в исследуемых торфяниках, оказывает влияние на особенности профильного распределения микроорганизмов, так как он способствует смене растительных группировок и определяет строение торфяной залежи – закономерное вертикальное напластование торфов.

Показатели обилия и разнообразия микроорганизмов в большей степени зависят от субстрата

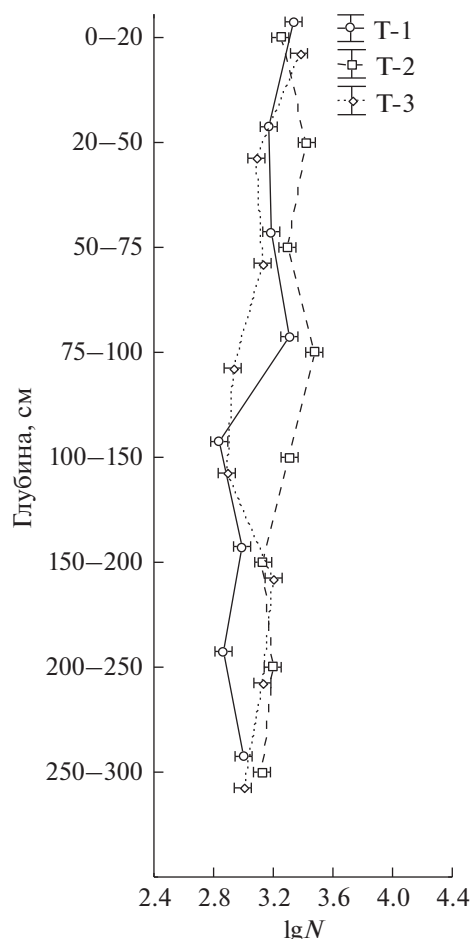


Рис 1. Распределение длины актиномицетного мицелия (N – м/г сухого торфа) по профилю исследуемых торфяников (T-1, T-2 и T-3).

[27, 29, 32]. В торфяниках одной из важнейших характеристик субстрата – торфа – является его ботанический состав. Предпринята попытка найти корреляцию между содержанием актиномицетного мицелия и ботаническим составом низинных торфов. Однофакторный дисперсионный анализ выявил существование достоверной зависимости (критерий Фишера (F) = 9.7 при уровне значимости $p < 0.001$). Длина актиномицетного

Таблица 2. Влияние различных факторов на содержание актиномицетного мицелия в исследуемых торфяниках (по результатам двухфакторного дисперсионного анализа)

Варьирование по градациям факторов*	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера	% от общей дисперсии	Уровень значимости
1	2	0.556	111.2	63	<0.001
2	17	0.219	43.8	23	
12	14	0.122	24.4	14	
Остаточное	120	0.006			

* Рассматриваемые факторы и их градации: 1 – “исследуемый торфяник” (торфяники 1, 2, 3); 2 – глубина отбора образцов (0–20, 20–50, 50–75, 75–100, 100–150, 150–200, 200–250, 250–300 см); 12 – совместное влияние факторов.

Таблица 3. Пределы колебаний биомассы актиномицетов (мкг/г сухого торфа) в разных слоях торфяников

Слой, см	Торфяник		
	1	2	3
0–50	58–103	55–140	44–100
50–100	55–96	64–128	29–58
100–200	23–51	51–90	26–70
200–300	22–45	45–68	35–56

мицелия возрастала в ряду низинных торфов: древесный < травяно-гипновый < травяной. Среди травяных торфов максимальные показатели выявляли для вахтового торфа. Количественная оценка потерь при разложении растительных остатков различных видов-торфообразователей в болотных экосистемах показала, что представители травяной растительности разлагаются быстрее, чем представители древесной и моховой групп. Оказалось, что потери при разложении фракций листьев, корневищ, корней вахты трехлистной были наибольшими (до 80% массы за 2 года опыта), чем при разложении других трав [2]. Вахтовый торф, в ботаническом составе которого преобладает вахта с наибольшей скоростью разложения среди трав, оказался благоприятным субстратом для актиномицетов. В слое залежи, сложенном этим видом низинного торфа, зарегистрированы не только максимальные показатели обилия актиномицетов, но и бактерий [6].

Как показал однофакторный дисперсионный анализ, существует достоверная зависимость длины актиномицетного мицелия от степени разложения низинного торфа ($F = 9.7$ при $p < 0.001$). Показатели обилия актиномицетного мицелия были больше в слоях низинного торфа со степенью разложения <35%. Эти слои в исследуемых торфяниках были представлены преимущественно торфами травяной группы. Травянистые растения, по сравнению со мхами, содержат больше целлюлозы. Микробиологическая деструкция проходит активно в слоях, где идет скопление органических веществ с повышенным содержанием целлюлозы, минеральных элементов и азота. С увеличением степени разложения торфа возрастает выход фенолсодержащих групп, которые являются дубителями и антиокислителями. Обилие фенольных групп в торфе приводит к торможению процессов минерализации органического вещества.

Актиномицетная биомасса в различных слоях профилей исследуемых торфяников колеблется от 22 до 140 мкг/г торфа (табл. 3). Запасы актиномицетной биомассы, при расчете на весь профиль, составляют 19–28 г/м². В деятельном слое торфяников они не превышают 6 г/м² – это 22–24% от актиномицетной биомассы всего профиля. Мощность инертного слоя торфяника в 5 раз больше деятельного, соответственно большая часть акти-

номицетной биомассы сосредоточена в нем. Следует отметить, что торфяники различного генезиса характеризуются близкими значениями актиномицетной биомассы в деятельном слое и отличаются не более чем в 1.5 раза в инертном слое. Максимальных значений (28 г/м²) актиномицетная биомасса достигала в торфянике 2 лесного заболочивания.

Актиномицетная биомасса является частью прокариотной биомассы. В исследуемых торфяниках прокариотная биомасса составляла от 309 до 370 г/м² [6]. На долю бактерий приходилось 88–96%, актиномицетного мицелия – 4–12% соответственно. Максимальной доля актиномицетного мицелия оказалась в торфянике 2, где ранее на всех глубинах выявляли наибольшие показатели его обилия.

Доля актиномицетного мицелия в прокариотной биомассе низинных торфяников других регионов России была всегда значительно меньше доли бактерий. Так, в низинных торфяниках карстовых ландшафтов Тульской области она не превышала 15% [4], в низинных торфяниках Тверской области варьировала от 7 до 25% [10]. В низинных высокозольных торфяниках под черноольшанниками ее значения не превышали 11% в неосушенных и 15% – в осушенных вариантах [8]. В низинных торфяниках Томской области доля актиномицетного мицелия в верхних слоях варьировала от 4 до 7%, в нижних слоях – от 0 до 3% [9].

Численность культивируемых актиномицетов в исследуемых торфяниках варьировала в широком диапазоне – от 10⁵ до 10⁷ КОЕ/г сухого торфа. Максимальные показатели были приурочены преимущественно к деятельному слою. С глубиной численность актиномицетов уменьшалась, но в отдельных слоях могла быть больше, чем в верхних слоях. Доля актиномицетов составляла от 1 до 26% от общей численности бактерий, учитываемых на используемой среде.

В торфяных почвах других регионов численность актиномицетов в верхних слоях колеблется от 10³ до 10⁶ КОЕ/г торфа, в нижних слоях – от 10³ до 10⁵ КОЕ/г торфа. Отмечается также особый характер профильного распределения культивируемых актиномицетов – без уменьшения численности с глубиной [12, 14, 15, 17]. Следует отметить, что речь идет о торфяных почвах, мощность которых не превышает 50–100 см, и данная тенденция описана именно для этой толщи.

Из исследуемых торфяников выделены 48 штаммов актиномицетов. В результате проведенной идентификации они отнесены к четырём родам: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium*. Доминировали по частоте встречаемости представители рода *Streptomyces* (85–100%), частота встречаемости других родов не превышала 15%. Эти роды актиномицетов обнаруживали в торфяных почвах других регионов. Их численность не превышала 10⁴–10⁵ КОЕ/г тор-

Таблица 4. Таксономический состав актиномицетов, выделенных из исследуемых торфяников

Род	Секция	Серия	Вид
<i>Streptomyces</i>	Cenereus	Chromogenes	<i>S. achromogenes</i>
			<i>S. graminofaciens</i>
			<i>S. noboritoensis</i>
			<i>S. xanthocidicus</i>
		Achromogenes	<i>S. gelaticus</i>
			<i>S. griseochromogenes</i>
			<i>S. wedmorensis</i>
	Chrysomallus	<i>S. viridogenes</i>	
	Violaceus	<i>S. ramulosus</i>	
	Helvolo-Flavus	Helvolus	<i>S. avicenniae</i>
			<i>S. cremeus</i>
			<i>S. felleus</i>
			<i>S. globisporus</i>
			<i>S. odorifer</i>
	Albus	Albus	<i>S. alborubidis</i>
Albocoloratus		<i>S. baarnensis</i>	
Azureus	Coerulescens	<i>S. caeruleus</i>	
Roseus	Lavendulae-Roseus	<i>S. lavendulae</i>	
		<i>S. lilacinus</i>	
<i>Micromonospora</i>	Aurantiaca	<i>M. aurantiaca</i>	
		<i>M. parva</i>	
	Nigra	<i>M. melanospora</i>	

фа. Об обнаружении в торфяных низинных почвах с помощью различных селективных приемов представителей редких родов актиномицетов, таких как *Actinomadura*, *Microbispora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora* и *Microtetraspora*, сообщается в работах [15, 17]. Представители рода *Streptomyces*, как правило, доминировали по всему профилю. В глубоких слоях они были единственными представителями порядка [13]. В исследуемых торфяниках актиномицеты рода *Streptomyces* обнаруживали по всему профилю торфяников 1 и 2, тогда как в торфянике 3 – в отдельных слоях и в минимальном количестве. Спецификой торфяника 3 является выделение из глубоких слоев актиномицетов рода *Streptosporangium*. Следует отметить, что у представителей этого рода, изолированных из торфяной и агроторфяной почв, обнаружена способность к микроаэрофильному росту [15], что позволяет им существовать в условиях дефицита кислорода, имеющего место в глубоких слоях торфяной залежи.

Особенностью торфяных почв считается также численное преобладание микромоноспоровых актиномицетов над стрептомицетами [13]. Многие представители этого рода обладают гидрофильными спорами и являются микроаэрофилами [16]. В исследуемых торфяниках микромоноспоровые выделяли преимущественно из деятельного слоя. Их доля в актиномицетном комплексе варьировала от 11 до 33%.

Стрептомицеты были отнесены к 19 видам из 9 серий и 5 секций, микромоноспоровые – к трем видам (табл. 4).

Актиномицеты, наряду с грибами, осуществляют в наземных экосистемах функции редуцентов – микроорганизмов, разрушающих органические вещества и возвращающих минеральные элементы в круговорот веществ. Основная роль актиномицетов состоит в разложении сложных полимеров – лигнина, хитина, гумусовых соединений и др. [13, 16, 21, 26, 32]. В деятельном слое торфяников стрептомицеты и микромоноспоровые занимают сходные экологические ниши и проявляют себя как гидролитики. В инертном слое торфяников эти функции выполняют преимущественно стрептомицеты.

Существование в торфяниках специфического водно-воздушного режима предполагает наличие в них микроорганизмов, способных существовать в условиях пониженного содержания кислорода в почвенном воздухе. В связи с этим коллекционные культуры представителей родов *Streptomyces* и *Micromonospora*, выделенные из исследуемых торфяников, были проверены на способность к микроаэрофильному росту. Установлено, что 70% культур из коллекции были способны к росту в этих условиях. Из них 30% росли на всю глубину столбика агаризованной овсяной среды, то есть обладали максимальной интенсивностью роста,

Таблица 5. Величина зон ингибирования (мм) роста тест-культур бактерий стрептомицетами, выделенными из исследуемых торфяников

Шагмы стрептомицетов	Тест-культуры бактерий*																					% от числа бактерий	
	верховой торфяник							низинный торфяник							подстиллки лесных болот								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	100	86	50	46	34	22	20	94	94	94	69	45	58	55	41	16	—	—	—	—	—	—**	
N-12				25	25	22			19	31		14	12					12	12			15	48
N-9				22																			5
N-5						12																	5
N-6						12																	5
N-19																							0
N-22										20								12					10
N-10								18		30	32								17			19	24
N-2						20						20					10		17			12	24
N-8						15				15	13						15		21		20	15	38
N-7	20			24	20	20				20	17						12	20	16		20	18	57
N-14						11				20	16	12			13								24
N-13						11				16	25	14						12	20		12	12	43
N-1						20				32			16										14
N-18						22					20	24		12				16	12	19		20	43
N-21										30								13	18	30	12	11	29
N-3					30	20				20	12							13	30		12	20	43
N-11					40	30	11		15	40	54	22	35		17		15	32	28	30	22	22	67
N-4				12	35	22				27				10			10	30	15	15	30	30	48
N-20						20										12		15					14
% от числа актиномицетов	5	0	5	10	32	63	16	0	21	63	37	47	21	10	10	5	47	53	53	37	37	58	

* Бактерии: 1 – *Pseudomonas psychrophila*, 2 – *Serratia liquefaciens*, 3 – *Paraburkholderia phytofirmans*, 4 – *Burkholderia bryophila*, 5 – *Delftia tsuruhatensis*, 6 – *Mucilaginibacter polytrichastri*, 7 – *Rouxietella badensis*, 8 – *Pseudomonas mandelii*, 9 – *Pseudomonas chlororaphis*, 10 – *Arthrobacter humicola*, 11 – *Microbacterium phyllosphaerae*, 12 – *Microbacterium foliorum*, 13 – *Pedobacter agri*, 14 – *Janthinobacterium lividum*, 15 – *Janthinobacterium svalbardensis*, 16 – *Flavobacterium luteum*, 17 – *Bacillus cereus (toyii)*, 18 – *B. lentus (clausii)*, 19 – *B. pumilus*, 20 – *B. globisporus (Sporosarcina globispora)*, 21 – *B. subtilis (natto)*.

** Не определяли.

и соответственно – 40% на глубину 1–3.5 см. Интенсивность роста в микроаэрофильных условиях была максимальной у представителей рода *Streptomyces* – *S. achromogenes*, *S. noboritoensis*, *S. viridogenes*, *S. cremeus*, *S. baarnensis*, рода *Micromonospora* – *M. aurantiaca*. Таким образом, можно говорить об адаптации некоторых видов актиномицетов к условиям дефицита кислорода, существующим в инертных слоях низинных торфяников.

Антагонистическая активность была проверена у 19 представителей рода *Streptomyces* (табл. 5). В качестве тест-культур использовали 21 вид бактерий, из них 7 были выделены из верховых торфяников, 9 – из низинных торфяников и 5 (бактерии рода *Bacillus*) – из подстилок лесных болот. Выбор тест-культур бактерий преследовал две цели: изучение взаимоотношений бактерий и стрептомицетов, являющихся характерными сапротрофными обитателями болот; поиск активных штаммов стрептомицетов.

Методом блоков было проверено 399 сочетаний. Появление зон подавления роста бактерий вокруг блоков стрептомицетов считали за положительный результат. Из 19 видов стрептомицетов 17 проявили антибактериальную активность. Она была высокой (зоны ингибирования тест-культур ≥ 20 мм) у 84% культур.

Доля стрептомицетов с широким спектром антагонистического действия (≥ 5 тест-культур) составила 63%. Наиболее активными оказались штаммы N-7 и N-11, представленные видами *S. avicenniae*, *S. caeruleus*. Они подавляли рост от 12 до 14 видов бактерий, то есть от 57 до 67% коллекции. Следует отметить, что видовая принадлежность активных штаммов стрептомицетов уточнена молекулярно-биологическими методами. *S. avicenniae* впервые был выделен из ризосферы растения *Avicennia marina* в Китае [37]. Представители этого вида используют сахара (ксилозу, галактозу, арабинозу, рамнозу, сахарозу), гидролизуют желатин, редуцируют нитраты; растут в диапазоне температур 15–37°C [37]; проявляют антагонистическую активность против *Esherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [36]. Вид *S. caeruleus* был впервые обнаружен и описан Балдаччи в 1944 г. Психротолерантных представителей этого вида выделяли из почв тундр и северной тайги [11]. Стрептомицеты этого вида использовали глюкозу, мальтозу, ксилозу, маннит, рамнозу, маннозу и сорбит [34]. Из аутентичной культуры *S. caeruleus* выделен антибиотик церуломицин, который ингибировал развитие грибов и дрожжей [30].

Анализ антагонистической активности показал, что стрептомицеты, выделенные из исследуемых торфяников, слабо подавляли рост бактерий, изолированных, как из низинных (24% от всех сочетаний для низинного торфяника), так и из верховых торфяников (19% от всех сочетаний

для верхового торфяника). Однако можно выделить отдельные виды бактерий из этих торфяников, рост которых угнетали 37–63% стрептомицетов. Это редко встречающиеся в верховом торфянике бактерии *Mucilaginibacter polytrichastri* и доминирующие и часто встречающиеся в низинном торфянике актинобактерии родов *Arthrobacter* и *Microbacterium*. Следует отметить, что от 37 до 58% штаммов стрептомицетов оказывали ингибирующее действие на спорообразующие бактерии (представителей рода *Bacillus*), что составило максимальную долю (44%) от сочетаний бациллы-стрептомицеты (табл. 5).

Изоляты из исследуемых торфяников, исходя из литературных данных [3], могут продуцировать не менее 22 антибиотиков, преимущественно антибактериальных широкого спектра действия.

Штаммы стрептомицетов N-(3, 4, 7, 11, 12, 18) с антибактериальной активностью 43–67% проверены на устойчивость к четырем антибиотикам (тетрациклин, гентамицин, левомицетин, канамицин), которые повреждают мембраны и ингибируют биосинтез белка в бактериальных клетках. Штаммы N-4 и N-18 обладали устойчивостью к одному антибиотику, N-3 – к двум, N-7, N-11 и N-12 – к четырем. Следует отметить, что штаммы N-7 и N-11 (*S. avicenniae*, *S. caeruleus*), проявляющие высокую антибактериальную активность, характеризовались множественной резистентностью к тестируемым антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование актиномицетных комплексов низинных торфяников различного генезиса. Люминесцентно-микроскопическим методом удалось обнаружить актиномицетный мицелий на всех глубинах трехметровых профилей торфяников. Исследуемые торфяники различались характером профильного распределения и показателями обилия актиномицетов. Максимально обогащен актиномицетной биомассой торфяник лесного заболачивания. Впервые выявлена достоверная зависимость содержания актиномицетного мицелия от ботанического состава и степени разложения торфов, слагающих профили исследуемых торфяников. Максимальные показатели обилия актиномицетного мицелия выявляли в слоях, представленных торфами травяной группы со степенью разложения <35%.

Из исследуемых торфяников удалось выделить представителей четырех родов актиномицетов (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium*). Доминирующие по частоте встречаемости представители рода *Streptomyces* были отнесены к 19 видам из 9 серий и 5 секций. Штаммы *S. avicenniae* и *S. caeruleus* обладали высокой антибактериальной активностью (подавляли

рост 57–67% бактерий) и характеризовались множественной резистентностью к антибиотикам.

На основании показателей обилия и видового богатства показано, что актиномицеты являются неотъемлемым компонентом прокариотного комплекса этих почв. У 70% изолятов выявлена способность к микроаэрофильному росту, что свидетельствует об адаптации актиномицетов к дефициту кислорода, существующему в глубоких слоях торфяников.

Представляется значимым, что стрептомицеты не подавляли развитие большинства бактерий, выделенных из низинных торфяников, что позволяет им эффективнее осуществлять свою совместную деятельность. Выявлен антагонизм между актиномицетами и спорообразующими бактериями, что может быть одной из причин низкой численности и неглубокого проникновения бактерицелл в толщу торфяников.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 21-14-00076. Исследования антагонистической активности стрептомицетов и резистентности их к антибиотикам выполнены Т.А. Грачевой, А.В. Головченко и Н.А. Манучаровой при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аветов Н.А., Шишконокова Е.А.* Некоторые аспекты систематики и диагностики торфяных почв бореальных болот // Почвоведение. 2019. № 8. С. 901–909.
2. *Вишнякова Е.К., Мироньчева-Токарева Н.П., Косых Н.П.* Динамика разложения растений на болотах Васюганья // Вестник ТГПУ (TSPU Bulletin). 2012. № 7(122). С. 87–93.
3. *Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С.* Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 247 с.
4. *Головченко А.В., Волкова Е.М.* Запасы и структура микробной биомассы в торфяниках карстовых ландшафтов Тульской области // Почвоведение. 2019. № 3. С. 370–376.
5. *Головченко А.В., Дмитриенко Ю.Д., Добровольская Т.Г., Грачева Т.А., Инишева Л.И., Кожевин П.А.* Численность, таксономическая структура и активность бактериальных комплексов низинных торфяников Томской области // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17, почвоведение. 2020. № 4. С. 43–51.
6. *Головченко А.В., Дмитриенко Ю.Д., Морозов А.А., Поздняков Л.А., Глухова Т.В., Инишева Л.И.* Микробная биомасса в низинных торфяниках: запасы, структура, активность // Почвоведение. 2021. № 7. С. 838–848.
7. *Головченко А.В., Полянская Л.М., Добровольская Т.Г., Васильева Л.В., Чернов И.Ю., Звягинцев Д.Г.* Особенности пространственного распределения и структуры микробных комплексов болотно-лесных экосистем // Почвоведение. 1993. № 10. С. 78–89.
8. *Головченко А.В., Тихонова Е.Ю., Звягинцев Д.Г.* Численность, биомасса, структура и активность микробных комплексов низинных и верховых торфяников // Микробиология. 2007. Т. 76. № 5. С. 711–719.
9. *Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Кухаренко О.С., Якушев А.В., Семенова Т.А., Инишева Л.И.* Структура микробных сообществ верховых и низинных торфяников Томской области // Почвоведение. 2012. № 3. С. 317–326.
10. *Добровольская Т.Г., Полянская Л.М., Головченко А.В., Смагина М.В., Звягинцев Д.Г.* Микробный пул в торфяных почвах // Почвоведение. 1991. № 7. С. 69–77.
11. *Дуброва М.С., Лубсанова Д.А., Макарова Е.П., Кожевин П.А., Манучарова Н.А., Зенова Г.М.* Психротолерантные актиномицеты в почвах тундры и северной тайги // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17, почвоведение. 2011. № 2. С. 3–8.
12. *Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Зенова Г.М., Смагина М.В.* Структура сапротрофного комплекса микроорганизмов в торфяниках // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 6. С. 155–164.
13. *Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М.* Экология актиномицетов. М.: Геос, 2001. 257 с.
14. *Зенова Г.М., Грядунова А.А., Дорошенко Е.А., Лихачева А.А., Початкова Т.Н., Судницын И.И., Звягинцев Д.Г.* Влияние влажности на жизнедеятельность актиномицетов в низинной торфяной почве // Почвоведение. 2007. № 5. С. 616–621.
15. *Зенова Г.М., Грядунова А.А., Поздняков А.И., Звягинцев Д.Г.* Аэробные и микроаэрофильные актиномицеты агроторфяной и торфяной типичных почв // Почвоведение. 2008. № 2. С. 235–240.
16. *Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г.* Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. 132 с.
17. *Зенова Г.М., Манучарова Н.А., Звягинцев Д.Г.* Экстремофильные и экстремотолерантные актиномицеты в почвах разных типов // Почвоведение. 2011. № 4. С. 457–478.
18. *Зименко Т.Г., Самсонова А.С., Мисник А.Г., Гаврилкина В.В., Филиппишанова Л.И.* Микробные ценозы торфяных почв и их функционирование. Минск: Наука и техника, 1983. 181 с.
19. *Кожевин П.А., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* Динамика развития различных микроорганизмов в почве // Микробиология. 1979. Т. 48. № 4. С. 490–494.
20. *Лысак Л.В., Лихачева А.А., Алферова И.В.* Методы выделения и изучения почвенных актиномицетов, продуцентов антибиотиков. М.: Макс Пресс, 2005. 80 с.
21. *Манучарова Н.А., Белова Э.В., Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г.* Хитинолитический актиномицетный комплекс чернозема // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 68–72.
22. *Методы почвенной биохимии и микробиологии.* М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
23. *Национальный атлас почв Российской Федерации / Ред. С.А. Шоба.* М.: Астрель: АСТ, 2011. 632 с.

24. Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
25. Alten H.K., Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., Handelsman J. Call of the wild antibiotic resistance genes in natural environments // *Nature Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. № 4. P. 251–258. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
26. Berg B., McClaugherty C. Decomposer organisms / *Plant Litter - Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. Netherlands: Springer, 2003. P. 31–48.
27. Chen J., Xie H.J., Zhuang X.L., Zhuang G.Q., Bai Z.H., Zhang H.X. Substrate induced changes in microbial community-level physiological profiles and their application to discriminate soil microbial communities // *J. Environ. Sci.* – China. 2008. V. 20. № 6. P. 725–731. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62119-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62119-1)
28. D'Costa V.M., Kins C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Golding G.B. Antibiotic resistance is ancient // *Nature*. 2011. V. 477. P. 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
29. Eilers K.G., Lauber C.L., Knight R., Fierer N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil // *Soil Biol. Biochem.* 2010. V. 42. P. 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.003>
30. Funk A., Divekar P.V. Caerulomycin, a new antibiotic from *Streptomyces caeruleus* Baldacci: I. Production, isolation, assay, and biological properties // *Can. J. Microbiol.* 1959. V. 5. № 4. P. 317–324. <https://doi.org/10.1139/m59-039>
31. Glukhova Tamara V., Ilyasov Danil V., Vompersky Stanislav E., Golovchenko Alla V., Manucharova Natalia A., Stepanov Alexey L. Soil Respiration in Alder Swamp (Alnus glutinosa) in Southern Taiga of European Russia Depending on Microrelief // *FORESTS*. 2021. V. 12. № 4. P. 496–514. <https://doi.org/10.3390/f12040496>
32. Peltoniemi K., Straková P., Fritze H., Iráizoz P.A., Pennanen T., Laiho R. How water-level drawdown modifies litter-decomposing fungal and actinobacterial communities in boreal peatlands // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 51. P. 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.013>
33. Schlatter D.C., Kinkel L.L. Do tradeoffs structure antibiotic inhibition, resistance and resource use among soil-borne Streptomyces? // *BMC Evolutionary Biol.* 2015. V. 15. № 1. Art. 186. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0470-6>
34. Tamura T., Ishida Y., Otaguro I.M. Reclassification of *Streptomyces caeruleus* as a synonym of *Actinoalloteichus cyanogriseus* and reclassification of *Streptomyces spheroides* and *Streptomyces laceyi* as later synonyms of *Streptomyces niveus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 2812–2814. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65560-0>
35. Waksman S.A. The Actinomycetes. Classification, Identification and description of genera and species. Baltimore: Williams and Willins Co., 1961. V. 2. 363 p.
36. Wardana R.S., Ryandini D., Oedjijono O. Antibacterial capacity of *Streptomyces avicenniae* isolate from a mangrove plant rhizosphere *Avicennia marina* // *Scripta Biologia*. 2017. V. 4. № 2. P. 131–134. <https://doi.org/10.20884/1.SB.2017.4.2.433>
37. Xiao J., Wang Y., Luo Y. et al. *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia marina* // *Int. J. System. and Evol. Microb.* 2009. V. 59. P. 2624–2628. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009357-0>

The Actinomycete Complexes of Eutrophic Peatlands

A. V. Golovchenko^{1, *}, T. A. Gracheva¹, V. A. Lypcan¹, T. G. Dobrovolskaya¹, and N. A. Manucharova¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: golovchenko.alla@gmail.com

The actinomycete complexes of eutrophic peatlands of various genesis was studied in order to broaden the knowledge of microorganisms' biodiversity in wetland ecosystems and to detect microorganisms with a high potential of antagonistic action. The research sites were eutrophic peatlands of lacustrine, forest and floodplain origin in Tver and Tomsk regions, Russia. In September of 2019 samples were taken from the peatlands (3 meter thick) layer-by-layer having regard to botanical composition of peats. The length and biomass of actinomycete mycelium was assessed by luminescent microscopic method, the number of culturable actinomycetes – by plate method. The species of actinomycetes were identified basing on morphological, cultural features and the analysis of 16S rRNA fragments. The antagonistic activity of streptomycetes was analysed by the method of agar blocks. The actinomycete mycelium was found throughout all the peatlands' profile. Its length varied from 700 to 3000 m per gram and its biomass – from 22 to 140 microgram per gram of dry peat. The verifiable correlation between the abundance of actinomycete mycelium and peat botanical composition was revealed for the first time. It was also found that the abundance of actinomycete mycelium depends on the degree of profile-forming peat decomposition. The actinomycete complex included representatives of the *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptovercillium* genera. The most dominant *Streptomyces* representatives in terms of occurrence frequency were assigned to 19 species from 9 series and 5 sections. 70% of studied actinomycetes showed the ability for microaerophilic growth. This fact indicates that those actinomycetes adapted to the oxygen deficiency present in the deep layers of peatlands. 89% of the isolates showed antibacterial activity. *S. avicenniae* and *S. caeruleus* proved to be the most active strains with antibacterial activity and multiple resistance to antibiotics.

Keywords: eutrophic peatlands, Sapric Histosols, actinomycete mycelium, culturable actinomycetes, microaerophilic growth, antibacterial activity, antibiotic resistance