

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 631.46.62

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУРАВЬЁВ *LASIUS NIGER* И *FORMICA CUNICULARIA*

Ю.В. Закалюкина^{1,*}, М.В. Бирюков², М.В. Голиченков¹, А.И. Нетрусов²

¹ Кафедра биологии почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

² кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: actinomyces@gmail.com

Из муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia* были выделены мицелиальные прокариоты, охарактеризованы их фенотипические свойства и установлено филогенетическое положение. Подавляющее большинство штаммов принадлежало к роду *Streptomyces*, и только один к роду *Nocardia*. Многие выделенные культуры имели значительные фенотипические отличия от наиболее близких в генетическом отношении видов. Численность и разнообразие актиномицетов, выделенных из муравьёв *L. niger*, значительно превышают таковые, установленные для *F. cunicularia*. Все стрептомицеты, ассоциированные с муравьями *F. cunicularia*, проявили целлюлолитическую активность; среди штаммов, связанных с чёрными муравьями, такой способностью обладал только один.

Ключевые слова: актиномицеты, муравьи, зоомикробные взаимодействия, *Lasius*, *Formica*, *Streptomyces*, 16S pPHK, резазурин

Многие авторы не раз отмечали, что мутуалистические микроорганизмы могут не только обеспечивать многих насекомых, в том числе муравьёв, питательными веществами для успешного роста и размножения [1, 2], но и защищать хозяев и их пищевые ресурсы от патогенов, паразитов и даже хищников [3–5]. Способность представителей порядка Actinomycetales использовать широкий круг источников углерода и азота, их обширный ассортимент вторичных метаболитов — предрасполагающие факторы для участия в симбиозах с насекомыми. Показано, что мутуалистические актинобактерии способны защищать различные виды муравьёв, жуков и ос от патогенных микроорганизмов путём выделения веществ с антибиотической активностью [6–9]. Так называемые “оборонительные симбиозы” с участием актиномицетов могут представлять собой общее и широко распространенное явление в экологии и эволюции насекомых [3]. Изучение же вторичных метаболитов, вовлеченных в эти мутуалистические взаимодействия, обещает обнаружение новых и перспективных соединений для биотехнологии.

Особенно многообещающими для выявления таких симбиозов являются муравьи-педобионты (например, широко распространенные на территории России виды *Lasius niger* и *Formica cunicularia*), поскольку их пищевые ресурсы и расплод, постоянно контактирующие с почвой, склонны к грибковым инвазиям [10]. Ранее авторами было показано, что сообщества актиномицетов, связанных с живыми муравьями *Lasius niger* и *Formica cunicularia*,

хотя и менее разнообразны, чем те, что выявлены в гнездах этих видов, но видовой состав специфичен для каждого вида муравьёв [11]. В прокариотных комплексах, связанных с жизнедеятельностью муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia*, доминируют представители рода *Streptomyces* [11, 12].

В данной работе мы ставим своей целью охарактеризовать таксономическое положение и отдельные физиологические свойства мицелиальных прокариот, выделенных их живых муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia*.

Материалы и методы

Отбор образцов и выделение актиномицетов

Муравьи *Lasius niger* Linnaeus, 1758 (чёрный садовый муравей) и *Formica cunicularia* Latreille, 1798 (прыткий степной муравей) были собраны летом 2013 г. в Касимовском районе Рязанской области (55°5'30" с.ш., 41°41'20" в.д.) на опытной территории, где более десяти лет изучаются сообщества муравьёв и их влияние на биологическую активность почв [11, 12, 13].

Подбор оптимальных условий и схема посева осуществлялись в соответствии с ранее полученными экспериментальными данными [11]. В качестве посевного материала были взяты взрослые рабочие *Lasius niger* и *Formica cunicularia* — 12 и 3 особи, соответственно. Поскольку муравьи данных видов заметно различаются по размеру, для приготовления суспензий, сравнимых по концентрации субстра-

та, необходимо знать средний вес особей обоих видов. С помощью взвешивания было установлено, что средний муравей *L. niger* весит $1,6 \pm 0,05$ мг, а *F. cunicularia* — $6,3 \pm 0,05$ мг.

Усыпленных эфиром насекомых вручную перетирали в течение 2 мин в ступке с 3 мл стерильной водопроводной воды, затем полученные суспензии 10 мин встряхивали на вортексе-шейкере Multi Reax (Heidolph, Германия) при 2000 об./мин. Полученные суспензии были десятикратно разведены стерильной водой для высева на питательную среду следующего состава (г/л): крахмал растворимый — 20, K_2HPO_4 — 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5, KNO_3 — 1, $NaCl$ — 0,5, $FeSO_4$ — 0,01, агар — 20. Для ограничения роста мицелиальных грибов и грамотрицательных бактерий в среду перед разливом добавляли нистатин (250 мкг/мл) и налидиксовую кислоту (7 мкг/мл). Чашки Петри с посевом инкубировали при 28°C в течение недели, после чего проводили учёт выросших колоний и выделение клонов для дальнейшей работы. Выделенные культуры мицелиальных прокариот хранили в пробирках со скошенной средой ISP 3 [14] при температуре 4°C.

Определение фенотипических и физиологических свойств выделенных культур

Изучение диагностических признаков выделенных культур проводили на спектре питательных сред, принятых в рамках Международного эксперимента по изучению стрептомицетов [14]: IPS 3, IPS 6, IPS 9, а также на минеральном агаре 1, органической среде 79, глицерин-нитратной среде [15]. Морфологические признаки изучали при помощи светового микроскопа Axiostar (Carl Zeiss, Германия).

Способность штаммов к ассимиляции различных субстратов в качестве единственного источника углерода исследовали в 96-луночном микропланшете (Greiner Bio-One, Австрия). В качестве полноценной минеральной основы в каждую ячейку вносили по 200 мкл жидкой среды ISP-9 с добавлением 1% углеродного субстрата: арабинозы, сахарозы, ксилозы, маннозы, фруктозы, рамнозы, раффинозы, растворимого крахмала, фильтровальной бумаги. Планшет инокулировали чистыми культурами актиномицетов и инкубировали в течение 5 сут при 28°C.

Эффективность утилизации различных источников углерода оценивали с применением кислотно-основного индикатора резазурина. Данный метод основан на способности живых метаболически активных клеток восстанавливать синий резазурин до ярко-розового резорурфина и очень удобен для определения роста микроорганизмов в минимальных объёмах среды в микропланшетах [16].

Для определения метаболической активности в каждую лунку планшета вносили по 25 мкг/мл резазурина (Sigma-Aldrich, США), который в присутствии метаболически активных клеток транс-

формировался в резорурфин. Инкубацию с резазурином проводили в течение 5 ч при температуре 28°C. Количественное определение образовавшегося резорурфина производили на микропланшетном флуоресцентном сканере Infinite F200 (Tecan, Австрия) при длинах волн возбуждения и эмиссии 560 нм и 590 нм соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с базовой средой ISP-9 без добавления источника углерода, в качестве положительного контроля выступала данная среда с 1% глюкозы.

Для каждого исследуемого штамма за 100% был принят вариант с наибольшим количеством образовавшегося резорурфина; для большинства штаммов таким субстратом была глюкоза, выбранная в качестве положительного контроля. Соответственно, остальные результаты были нормированы от 0 до 100% и ранжированы (табл. 2): менее 10% — субстрат не утилизируется (–); 10–40% — слабый рост и метаболизм (±); 40–70% — хороший рост и утилизация субстрата (+); более 70% — интенсивный рост, бурный метаболизм (++)

Определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК

Филогенетическое положение выделенных штаммов определяли на основе анализа фрагментов 16S рРНК и сопоставления их с аналогичными фрагментами из базы данных GenBank.

Геномную ДНК выделяли при помощи набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для амплификации региона ДНК, содержащего ген 16S рРНК, использовали пару праймеров, специфичную для порядка Actinomycetales: прямой 243F 5'-GGATGAGCCCGCGGCTA-3' и обратный A3R 5'-CCAGCCSACCTTCGAC-3' [17], а также смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) ScreenMix (Евроген, Россия). ПЦР проводилась в амплификаторе T100 (BioRad, США) по следующей программе: начальная денатурация — 5 мин при 95°C; затем 30 циклов: денатурация — 4 с при 94°C, отжиг праймеров — 120 с при 68°C, синтез ДНК — 90 с при 72°C; финальная элонгация — 10 мин при 72°C.

Полученные ПЦР-продукты проверяли на наличие целевого фрагмента ДНК с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле и передавались вместе с образцами праймеров в НПК "Синтол" (Москва) для очистки и секвенирования. Полученные нуклеотидные последовательности сопоставляли с материалом, депонированным в генбанке NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), с применением программного пакета GeneStudio Pro v.2.2.0.0 (<http://genestudio.com>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева осуществляли с помощью программы MEGA v.7 (<http://www.mega-software.net/>).

Результаты и обсуждение

Ранее авторами был проведён сравнительный анализ биоразнообразия актиномицетов, связанных с гнёздами муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia*, в результате которого было показано, что актиномицетные сообщества, обнаруживаемые в гнёздах этих муравьёв, близки по показателями α -биоразнообразия к сообществу интактной почвы. Однако комплексы актиномицетов, связанные с живыми насекомыми, во-первых, значительно отличаются от сообществ гнёзд, а во-вторых, уникальны для каждого вида муравьёв [11]. Поэтому для более детального изучения сообществ мицелиальных прокариот, связанных с живыми муравьями, были отобраны рабочие особи *Lasius niger* и *Formica cunicularia* из тех же гнёзд, которые исследовались четырьмя годами ранее.

Было установлено, что, несмотря на меньшие размеры особей, актиномицетный комплекс, связанный с чёрными муравьями, разнообразнее и многочисленнее такового у муравьёв рода *Formica*. Так, удельная численность мицелиальных прокариот, выделенных из муравьёв *Lasius niger*, составляет $(2,6 \pm 0,39) \cdot 10^6$ КОЕ/г биомассы муравья, что на порядок выше таковой, выявленной для муравьёв *Formica cunicularia* — $(1,9 \pm 0,28) \cdot 10^5$ КОЕ/г муравья. Число морфотипов, выделенных из гомогенизата *L. niger*, также вдвое выше, чем в посевах из *Formica cunicularia* — десять и пять штаммов, соответствен-

но. Таксономическая идентификация выделенных штаммов, основанная на анализе фрагментов генов 16S рРНК, показала, что почти все они являются представителями рода *Streptomyces* (табл.1).

Результаты оценки общей численности и разнообразия актиномицетов, обнаруживаемых методом посева из гомогенизатов живых насекомых, полностью соответствуют ранее полученным данным для тех же видов муравьёв [11]. Также подтвердились и другие ранее отмеченные закономерности: отсутствие общих видов мицелиальных прокариот у муравьёв *L. niger* и *F. cunicularia*; большие численность и видовое богатство актиномицетов, связанных с чёрными муравьями, несмотря на их меньшие размеры.

Проводить видовую идентификацию стрептомицетов, основываясь исключительно на анализе гена 16s рРНК, весьма затруднительно, поскольку нуклеотидные последовательности данного гена обладают высоким сходством для представителей всех таксонов внутри семейства *Streptomycetaceae* [18]. Для сопоставления с генетическими данными информации о фенотипических признаках мы изучали культуральные (цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие и цвет растворимого пигмента), морфологические (форма цепочек спор), а также физиологические признаки (спектры усвоения различных субстратов) выделенных штаммов (табл. 1, 2).

Несмотря на то, что в последнее время таксономическая значимость такого признака, как потреб-

Таблица 1

Культуральные и морфологические признаки выделенных актиномицетов

Штамм*	Цветовые группы по Гаузе и др., 1983		МП**	Форма цепочек спор***	Идентифицирован как
	Секция	Серия			
Ln1	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	+	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln3	<i>Roseus</i>	<i>Roseoviolaceus</i>	+	S	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln5	<i>Albus</i>	<i>Albus</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln6	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln7	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln8	<i>Helvolo-Flavus</i>	<i>Helvolus</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln9	<i>Cinereus</i>	<i>Aureus</i>	+	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln11	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	+	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln13	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Ln15					<i>Nocardia</i> sp.
Fu1	<i>Cinereus</i>	<i>Chromogenes</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Fu2	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	+	RA	<i>Streptomyces</i> sp.
Fu4	<i>Helvolo-Flavus</i>	<i>Helvolus</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.
Fu5	<i>Cinereus</i>	<i>Violaceus</i>	–	RA	<i>Streptomyces</i> sp.
Fu6	<i>Cinereus</i>	<i>Achromogenes</i>	–	RF	<i>Streptomyces</i> sp.

* — штаммы, выделенные из муравьёв *L. niger*, обозначены Ln; штаммы, выделенные из *F. cunicularia* — Fu;

** — образование меланоидного пигмента (МП) оценивали на среде ISP-6 [14];

*** — изучали на среде ISP-3: RF — прямые, RA — крючки и петли, S — спиральные спороносцы [15].

Таблица 2

Утилизация различных источников углерода выделенными актиномицетами. ОК — отрицательный контроль, ГЛ — глюкоза, АР — арабиноза, СХ — сахароза, КС — ксилоза, МН — манноза, ФР — фруктоза, РМ — рамноза, РФ — раффиноза, КР — растворимый крахмал, ФБ — фильтровальная бумага

Штамм	ОК	ГЛ	АР	СХ	КС	МН	ФР	РМ	РФ	КР	ФБ
Ln1	—	++	±	++	++	±	++	++	++	++	±
Ln3	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—
Ln5	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±
Ln6	—	++	+	++	++	++	++	+	++	++	±
Ln7	-	++	+	++	++	+	++	+	++	++	±
Ln8	—	±	—	—	++	—	±	+	+	++	±
Ln9	—	++	+	++	++	±	++	++	++	++	±
Ln11	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ln13	—	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±
Ln15	—	±	±	±	++	±	±	—	±	+	—
Fu1	—	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++
Fu2	—	++	++	++	+	+	++	+	+	++	++
Fu4	—	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++
Fu5	—	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++
Fu6	—	++	++	++	+	±	+	±	±	++	+

ление актиномицетами углеводных субстратов, подвергается сомнению, данная информация может быть полезной в изучении экологических особенностей рассматриваемых организмов.

Было установлено, что универсальным субстратом оказалась не глюкоза, выбранная в качестве позитивного контроля, а ксилоза — которую активно метаболизировали все изучаемые штаммы. Большинство выделенных актиномицетов активно потребляли все предложенные пентозы и гексозы, кроме штаммов Ln8 и Ln15, предпочитавших только ксилозу.

Способность к гидролизу полимеров — крахмала и целлюлозы — является характерной чертой мицелиальных прокариот. Амилолитическая активность отмечена у всех рассмотренных штаммов, однако по способности к гидролизу целлюлозы изучаемые культуры разделились. Все штаммы, выделенные из муравьёв *Formica cunicularia*, проявили выраженную способность к утилизации целлюлозы, в то время как среди штаммов, выделенных из муравьёв *L. niger*, подобную активность проявил только штамм Ln11 (табл. 2).

По мнению авторов, осуществивших крупный проект по филогенетическому анализу видов внутри семейства *Streptomycetaceae* [18], принятая в литературе величина сходства последовательностей гена 16s рРНК выше 98,5% как основание для видовой идентификации организмов — не является достоверной для стрептомицетов. Таксономическое значение последовательности данного генетического

локуса состоит в родовой идентификации или подтверждении новизны неизвестных штаммов стрептомицетов, особенно там, где есть корреляция с морфологическими и физиологическими признаками [18]. Те же авторы при анализе филогенетической иерархии предлагают считать достоверной величину кластеризации изучаемых видов (bootstrap) более 60%.

Штаммы, для которых удалось найти нуклеотидные последовательности, принадлежащие культурам с однозначным генотипическим и фенотипическим соответствием: Ln3 и *S. tauricus* JCM 4837, а также Fu2 и *Streptomyces rishiriensis* JCM 4686 — что подтверждается очень высокой достоверностью кластеризации (98% и 99% соответственно, рисунок).

Для штаммов Fu4 и Fu5 — среди предложенных поисковым сервисом BLAST наиболее близких по последовательностям — были выбраны фенотипически сходные *S. prunicolor* NBRC 13075 и *S. bobili* cfcc3161, достоверность кластеризации с которыми соответственно составляет 87 и 67% (рисунок).

Для нуклеотидной последовательности штамма Ln5 была найдена соответствующая последовательность у фенотипически идентичной культуры *Streptomyces anulatus* KCTC 9710 с уровнем сходства 100% (табл. 3). Достоверность объединения данных нуклеотидных последовательностей совместно с *Streptomyces globosus* NBRC 15874 в один кластер составляет 76% (рисунок), что позволяет предполагать их филогенетическую близость.

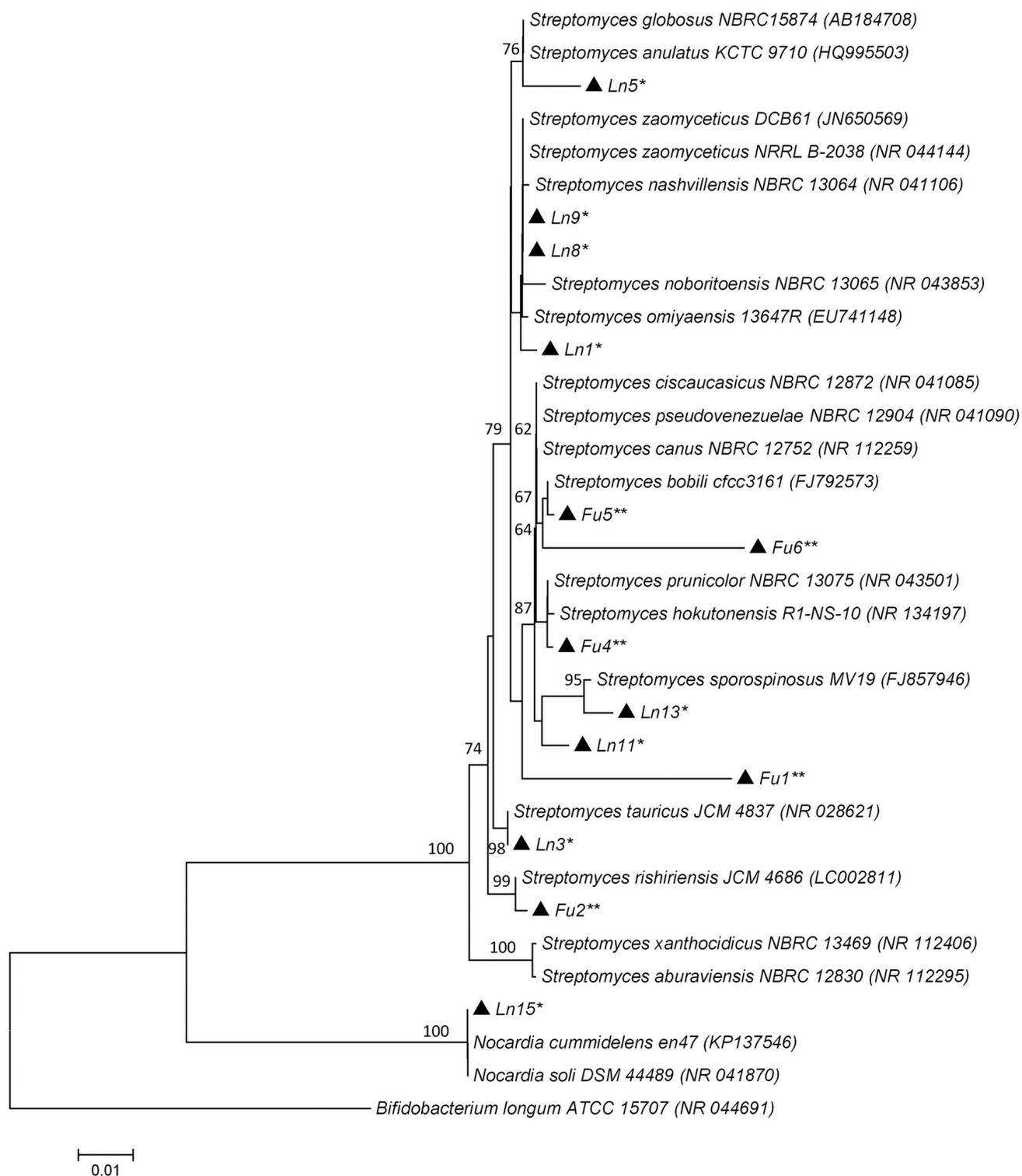


Рисунок. Филогенетическое древо последовательностей 16S рРНК, принадлежащих актиномицетам (904 п.н.), выделенным из муравьёв *L. niger* (*) и *F. cunicularia* (**), и коллекционным штаммам, наиболее близким им генетически (в скобках указан номер доступа в GenBank). Филограмма построена методом “ближайшего соседа” (neighbour-joining method). Указаны величины достоверности кластеризации (bootstrap) для узлов, характеризующихся значениями выше 60%. Эволюционное расстояние рассчитано с помощью алгоритма максимального правдоподобия (maximum likelihood), отрезок показывает 0,01 нуклеотидных замещений на участок. Штамм *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 был выбран как референсный организм, не принадлежащий к родам *Streptomyces* и *Nocardia*. Маркером ▲ помечены штаммы, выделенные в рамках нашего исследования

Для штамма L_n13, выделенного из муравья *L. niger*, было обнаружено 100%-ное генотипическое соответствие штамму *Streptomyces sporospinosus* MV19 (табл. 3), выделенному из задней кишки южно-африканского термита *Microhodotermes viator* [19].

Однако, несмотря на максимальное генетическое соответствие, данные штаммы различались формой спороносцев: L_n13 образовывал на всех питательных средах прямые цепочки спор, в отличие от *Streptomyces sporospinosus* MV19, характеризую-

Таблица 3

Филогенетический анализ актиномицетов, выделенных из муравьёв *Lasius niger* и *Formica cunicularia*, основанный на сравнении фрагмента гена 16s рНК

Штамм	Источник выделения	Ближайшие родственные организмы в GenBank	Номер доступа	Сходство, %
Ln1	Муравьи <i>Lasius niger</i>	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> DCB61	JN650569	99
Ln3		<i>Streptomyces tauricus</i> JCM 4837	NR_028621	99
Ln5		<i>Streptomyces anulatus</i> KCTC 9710 * <i>Streptomyces globosus</i> NBRC 15874	HQ995503 AB184708	100 99
Ln6		<i>Streptomyces xanthocidicus</i> NBRC 13469	NR_112406	99
Ln7		<i>Streptomyces prunicolor</i> NBRC 13075	NR_043501	99
Ln8		<i>Streptomyces omiyaensis</i> 13647R * <i>Streptomyces aburaviensis</i> NBRC 12830	EU741148 NR_112295	98 96
Ln9		<i>Streptomyces zaomyceticus</i> NRRL B-2038	NR_044144	99
Ln11		<i>Streptomyces ciscaucasicus</i> NBRC 12872 <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> NBRC 12904 <i>Streptomyces canus</i> NBRC 12752 * <i>Streptomyces nashvillensis</i> NBRC 13064	NR_041085 NR_041090 NR_112259 NR_041106	99 99 99 97
Ln13		<i>Streptomyces sporospinosus</i> MV19	FJ857946	100
Ln15		<i>Nocardia soli</i> DSM 44489 * <i>Nocardia cummidelens</i> en47	NR_041870 KP137546	100 99
Fu1		Муравьи <i>Formica cunicularia</i>	<i>Streptomyces noboritoensis</i> NBRC 13065	NR_043853
Fu2	<i>Streptomyces rishiriensis</i> JCM 4686.		LC002811	99
Fu4	<i>Streptomyces prunicolor</i> NBRC 13075		NR_043501	99
Fu5	<i>Streptomyces bobili</i> cfcc3161		FJ792573	99
Fu6	<i>Streptomyces hokutonensis</i> R1-NS-10		NR_134197	98

Примечание: знаком (*) отмечены референсные виды, обладающие большим фенотипическим сходством, чем генотипическим, с исследуемыми штаммами.

щегося наличием спиральных спораносцев. Достоверность объединения данных организмов в один кластер составляет 95%, что следует рассматривать как показатель высокого филогенетического родства (рисунок).

Из всех стрептомицетных последовательностей, предложенных базой данных GenBank с 99% уровнем сходства для штамма Ln1, ни один из коллекционных штаммов не соответствовал ему по всем фенотипическим признакам. Для филогенетического анализа нами была выбрана последовательность, принадлежащая культуре *Streptomyces zaomyceticus* DCB61 с наименее значимыми фенотипическими отличиями от штамма Ln1: окраска субстратного мицелия и растворимый пигмент штамма Ln1 на крахмальной и овсяной средах были красновато-бурыми, в отличие от ярко-жёлтых, свойственных для *S. zaomyceticus* [15]. Филогенетический анализ как минимум не подтвердил никакой близости между этими штаммами (рисунок).

Для стрептомицета Ln9 среди предложенных поисковым алгоритмом последовательностей с 99%-ным сходством была выбрана последовательность, при-

надлежащая штамму *S. zaomyceticus* NRRL B-2038 как фенотипически наиболее соответствующая. Однако в построенном филогенетическом древе достоверность кластеризации штамма Ln9 с группой видов, близких к *S. zaomyceticus* NRRL B-2038, оказалась ниже пороговой. Надо заметить, что нуклеотидные последовательности штаммов *S. zaomyceticus*, хранящихся в разных коллекциях (NRRL, США и DCB, Китай), также не составили единого кластера с высокой величиной достоверности.

Коллекционные штаммы, нуклеотидные последовательности которых были выданы BLAST для штамма Ln11 как сходные на 99% (табл.3), совершенно не соответствовали этому штамму по фенотипическим признакам. Но и на филогенетическом древе они даже не попали в один достоверно выделенный кластер (рисунок).

Все нуклеотидные фрагменты, выданные BLAST для штаммов Ln8, Fu1 и Fu6, соответствовали не более чем на 98% введенным последовательностям, что, как отмечалось выше, является недостаточным основанием для видовой идентификации. Неудивительно, что эти предлагаемые последовательности

принадлежали видам, описание которых не соответствует наблюдаемым у исследуемых штаммов фенотипическим признакам. Тем не менее, для филогенетического анализа были выбраны последовательности, с максимальным нуклеотидным сходством, однако достоверных связей выявлено не было. Низкая для стрептомицетов величина сходства нуклеотидных последовательностей может стать отправной точкой для проверки гипотезы о принадлежности данных штаммов к новым видам.

Все выше упомянутые штаммы, без сомнения, принадлежат к роду *Streptomyces*, поскольку объединяются со всеми коллекционными культурами стрептомицетов в один кластер с максимальной достоверностью — 100% (рисунок).

Штамм Ln15 — единственный выделенный актиномицет, не принадлежащий к роду *Streptomyces*, обладает фенотипическим и генотипическим сходством с коллекционным штаммом *Nocardia soli* DSM 44489, образуя с ним единый кластер с максимальной достоверностью (рисунок).

Изучение актиномицетных сообществ, связанных с муравьями, остается по-прежнему мало исследованной областью зоомикробных взаимодействий. Кроме хрестоматийного примера мутуализма между муравьями-грибоводами из трибы *Attini* и актинобактериями *Pseudonocardia* [4–6, 20], данных по распространению и характеру взаимоотношений между актиномицетами и муравьями других видов в литературе крайне мало. В то же время в последние годы звучат мнения, что наличие экзо- и эндосимбионтов у насекомых — не уникальное явление, а общее правило, и функциональные роли микробных участников в таких союзах могут быть гораздо шире и разнообразнее, чем только “оборонительные” или “пищевые” [3, 5].

В рамках настоящей работы удалось подтвердить ранее полученные нами данные о том, что актиномицетные комплексы, связанные с муравьями *L. niger*, более многочисленны и разнообразны по сравнению с таковыми, выделенными из муравьёв *F. cunicularia*. При этом каждый вид муравьёв обладает уникальным набором ассоциированных актиномицетов, подавляющее большинство которых принадлежит к роду *Streptomyces* [11, 12].

Данные об исследованиях актиномицетных сообществ, ассоциированных с муравьями, не принадлежащими к экологической группе “грибоводов”, в литературе единичны [8, 12]. Первенство в выборе муравьёв *L. niger* и *F. cunicularia* в качестве объектов сравнительного исследования зоомикробных взаимодействий принадлежит авторам настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Russell J.A., Moreau C.S., Goldman-Huertas B., Fujiwara M., Lohman D.J., Pierce N.E. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106. N 50. P. 21236–21241.

Нами впервые была оценена эффективность утилизации различных источников углерода культурами стрептомицетов в формате 96-луночного микропланшета с применением кислотно-основного индикатора резазурина. Данная методика обладает рядом принципиальных достоинств по сравнению с традиционным посевом на спектр плотных питательных сред: требует малых объёмов среды, позволяет одновременно исследовать большое количество объектов, характеризуется быстрой и объективной оценкой результатов. Хотя в настоящее время способность стрептомицетов ассимилировать те или иные источники углерода не является значимым таксономическим признаком, она может служить основой для исследования функциональной роли актиномицетов в сообществе.

Установлено, что все стрептомицеты, ассоциированные с муравьями *F. cunicularia*, проявляют заметную целлюлозолитическую активность, а то время как среди штаммов, связанных с чёрными муравьями, подобная активность выявлена только у одного. Столь заметная дифференциация между актиномицетными сообществами в отношении утилизации полимера растительного происхождения может указывать на присутствие растительных остатков в сфере обитания *F. cunicularia*. Однако данное предположение требует экспериментальной проверки, поскольку теоретически экология этих видов муравьёв очень близка: и те, и другие строят гнёзда в почве одного участка, пищевые ресурсы обоих видов представлены падью тлей и насекомыми. Из возможных отличий известно, что *F. cunicularia* относительно более теплолюбивый вид и его гнёзда залегают на большую глубину, чем у *L. niger* [10]. Возможно, разная глубина залегания гнёзд отражается на флористическом составе, сопутствующем гнёздам муравьёв разных видов. С другой стороны, возможно, что кормовые участки связаны с разными видами растений. Без сомнения, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК всех выделенных штаммов показало, что часть культур обладает значительными фенотипическими отличиями от наиболее близких видов, предлагаемых поисковым алгоритмом BLAST. Для штаммов Ln8, Fu1 и Fu6 сходство с последовательностями из базы данных GenBank оказалось не выше 98%, что может служить основанием для проверки гипотезы о принадлежности данных штаммов к новым видам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

2. de Souza D.J., Bezier A., Depoix D., Drezen J.-M., Lenoir A. *Blochmannia* endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah* // BMC Microbiol. 2009. Vol. 9. N 29. P. 1–8.

3. *Kaltenpoth M.* Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? // *Trends Microbiol.* 2009. Vol. 17. N 12. P. 529–535.
4. *Schoenian I., Spitteller M., Ghaste M., Wirth R., Herz H., Spitteller D.* Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108. N 5. P. 1955–1960.
5. *Mueller U.G.* Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant-microbe symbiosis // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. Vol. 15. N 3. P. 269–277.
6. *Poulsen M., Cafaro M., Boomsma J.J., Currie C.R.* Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants // *Mol. Ecol.* 2005. Vol. 14. N 11. P. 3597–3604.
7. *Kaltenpoth M.* “Candidatus *Streptomyces philanthi*,” an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus* digger wasps // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. Vol. 56. N 6. P. 1403–1411.
8. *Kost C., Lacatos T., Btcher I., Arendholz W.-R., Redenbach M., Wirth R.* Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants // *Naturwissenschaften.* 2007. Vol. 94. N 10. P. 821–828.
9. *Scott J.J., Oh D.-C., Yuceer M.C., Klepzig K.D., Clardy J.* Bacterial protection of beetle-fungus mutualism // *Science.* 2008. Vol. 322. N 5898. P. 63.
10. *Захаров А. А.* Муравьи лесных сообществ, их жизнь в лесу. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2015. 404 с.
11. *Zakalyukina Yu.V., Golichenkov M.V., Brovkina O.I., Putyatina T.S.* Comparative study of actinomycete communities associated with *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants and their nests // *Mos. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 3. P. 118–124.
12. *Golichenkov M.V., Novoselov A.L., Marfenina O.E., Dobrovolskaya T.G., Zakalyukina Yu.V., Lapygina E.V., Zamolodchikov D.G.* Microbiological characteristic of anthills of *Lasius niger* // *Biol. Bull.* 2011. Vol. 38. N 3. P. 277–282.
13. *Голыченков М.В., Нейматов А.В., Кирюшин А.В.* Микробиологическая активность почв, заселенных муравьями *Lasius niger* // *Почвоведение.* 2009. № 7. С. 847–852.
14. *Shirling E., Gottlieb D.* Methods for characterization of *Streptomyces* species // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966. Vol. 16. N 3. P. 313–340.
15. *Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С.* Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 248 с.
16. *Karuppusamy S., Rajasekaran K.M.* High throughput antibacterial screening of plant extracts by resazurin redox with special reference to medicinal plants of Western Ghats // *Glob. J. Pharmacol.* 2009. Vol. 3. N 2. P. 63–68.
17. *Monciardini P., Sosio M., Cavaletti L., Chiochini C., Stefano D.* New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. Vol. 42. N 3. P. 419–429.
18. *Labeda D.P., Goodfellow M., Brown R., et al.* Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae* // *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 2012. Vol. N 1. 101. P. 73–104.
19. *Rohland J.* Investigating the actinomycete diversity inside hindgut of an indigenous termite, *Microhodotermes viator*. PhD thesis. University of Cape Town, 2010. 239 p.
20. *Currie C.R.* A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. Vol. 55. P. 357–380.

Поступила в редакцию
20.09.2016
Принята в печать
02.12.2016

MICROBIOLOGY

PHENOTYPIC AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM THE ANTS *LASIUS NIGER* AND *FORMICA CUNICULARIA*

Yu.V. Zakalyukina^{1,*}, *M.V. Biryukov*², *M.V. Golichenkov*¹, *A.I. Netrusov*²

¹ *Department of Soil Biology, School of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*

² *Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*

*e-mail: *actinomycet@gmail.com*

Multiple actinomycete strains were isolated from two ant species, *Lasius niger* and *Formica cunicularia*, and their phenotypic properties and phylogenetic position were studied. Partial sequencing of 16S rRNA assigned the most part of them to the genus *Streptomyces*, but only one belonged to the *Nocardia*. However, some isolates had got significant color and morphological differences from their closest phylogenetic relatives. The abundance and biodiversity of actinomycete communities isolated from ants *L. niger* greatly exceeded those found for *F. cunicularia*. All of the actinomycetes associated with ants *F. cunicularia* demonstrated cellulolytic activity but among the strains associated with black ants only one had such ability.

Keywords: *actinobacteria, actinomycetes, ant-microbe symbiosis, Lasius, Formica, Streptomyces, 16S rRNA gene, resazurin*

Сведения об авторах

Закалюкина Юлия Владимировна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-44-46; e-mail: *actinomycet@gmail.com*

Бирюков Михаил Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-46; e-mail: *biryukov@mail.bio.msu.ru*

Голыченков Максим Владимирович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-35-46; e-mail: *ajfen@mail.ru*

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: *anetrusov@mail.ru*