



<https://doi.org/10.5564/pib.v37i1.3134>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Enzymatic activities of actinomycetes isolated from soil in Tuv province of Mongolia

Pagmadulam Baldorj*, Sainbileg Purevjav, Oyukhan Khandaa, Rentsenkhand Tserennadmid

Laboratory of Microbial Synthesis, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences

Received 14 July 2021; received in revised form 8 October 2021; accepted 1 November 2021

Abstract

Actinomycetes found in diverse ecosystems around the world are characterized by wide range of clinically and industrially important natural products. In this study, agricultural soil samples were collected from Tuv province of Mongolia. Two actinomycetes strains (N23, N24) were isolated and selected for polyphasic approaches, including morphological, physiological and phylogenetic analysis. Morphological characteristics of strains were observed on different international *streptomyces* project media (ISP media). All strains were aerobic, gram-positive that have branches substrate mycelium with aerial mycelium differentiated. Phylogenetic analysis of these isolates revealed that they share highest similarity with *Streptomyces shaanxiensis* CCNWHQ 0031(T) FJ465151 (N23) and *Streptomyces wuyuanensis* FX61T(T) (JX010725) (N24), based on 16S rRNA gene sequencing. Then, enzymatic activities of actinomycetes were evaluated. The strain N23 possessed amylase and urease activities. The strain N24 showed good enzymatic activities with the enzyme amylase, urease, lipase, and protease activities, respectively.

Keywords: Actinomycetes, rRNA gene, soil, phylogenetic, enzyme

Introduction

The number of bioactive secondary metabolites produced by microorganisms is reported to be around 23,000 of which 10,000 are produced by actinomycetes. Among actinomycetes, approximately 7,600 compounds are produced by *Streptomyces* species and they have become the primary antibiotic-producing organisms used in the pharmaceutical industry [1]. Most valuable antibiotics were produced by actinomycetes, that are used today in treating many infectious diseases.

Actinomycete are filamentous gram-positive bacteria, characterized by a complex life cycle, belonging to the phylum *Actinobacteria*, which represents one of the largest taxonomic units. *Actinobacteria* are widely distributed in both terrestrial and aquatic ecosystems, mainly in soil, where they play an essential role in recycling refractory biomaterials by decomposing complex

mixtures of polymers in dead plants and animals.

Actinomycetes produce various extracellular enzymes and main sources of valuable enzymes for use in a number of industrial applications. Commercially available enzymes originating from actinomycetes include protease, cellulase, lipase, xylanase, pectinase, amylase, lipooxygenase glucose oxidase and peroxidase etc. that can be used in different industries [2].

Mongolia is known as a home country to many different species of microorganisms for production of useful bio-resources. From the early 1990s, Mongolian researchers have conducted studies on isolation and screening of potential bioactive secondary metabolites from actinomycetes in Mongolia. Moreover, rare species of actinomycetes have been isolated from Mongolia [3][4][5][6][7]. Tsetseg et al., isolated actinomycetes of the genus *Amycolatopsis* as a producer of clinically

*Corresponding author:

E-mail address: pagmadulam_b@mas.ac.mn

important antibiotics from Khuvsgul and Uvs provinces and evaluated their antimicrobial activities [8]. Pagmadulam et al., isolated antiprotozoal compounds producing *Streptomyces* sp. from Mongolian soils [9]. Moreover, Mongolian researchers proposed 1 new genus and 8 new species of actinomycetes from Mongolia [10][11] [12]. Recently, a novel endophytic actinomycete (designated as *Actinocatenispora comari* sp. nov.) has been isolated from *Comarum salesowianum*, collected from Khasagt Khaikhan Mountain in Mongolia [13]. Therefore, general objectives of the present research are isolation and identification of actinomycetes from soils in Tuv province of Mongolia.

Material and methods

Isolation: Soil samples were collected from Tuv province of Mongolia. Soil samples were collected by removing the surface loose litter layer, underlying 5 to 10 cm depth. Samples were dried and appropriate aliquots of the dilutions prepared in saline were spread on Gauze No 1 media.

Growth studies on different ISP media: The following media were used for growth studies. Tryptone yeast extract agar (ISP1), yeast extract malt extract agar (ISP 2), Oatmeal agar (ISP 3), Inorganic salts-starch agar (ISP4), Glycerol-asparagine agar (ISP5), Peptone yeast iron agar (ISP6), Tyrosine agar (ISP7). Cultures were inoculated on above mentioned media plates and incubated for 14 days at 28°C until observed for appearance of growth, sporulation, color of substrate mycelium, color of aerial mycelium and production of diffusible pigment.

Utilization of carbon sources: 5 ml of basal medium ((NH₄)₂SO₄ 1g, KCl 0.2g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, Bromocresol purple 0.04%) was dispensed. The 20% stock solution of sugars was prepared and cultures were grown for 14 days at 28°C. Acid production from different carbohydrates was observed regularly for 14 days. Sugars used for carbon utilization were D-glucose, D-mannitol, D-xylose, L-arabinose, D-galactose, meso-inositol, raffinose, D-mannose and melezitol.

Phylogenetic analysis: The samples were given with 5 sets of primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 536R, 786F, 939R and 1492R(5'TACGGTTACCTGTTACGACTT-3'). Sequencing was done by the Micro Seq^R 16S rRNA gene sequencing kit (Applied biosystems, USA) and Applied Biosystems 3100 AvantTM Genetic Analyzer Sequencer. Resultant sequences for strains were assembled manually using Sequence Analysis 5.1.1 and aligned with sequences of available *Streptomyces* drawn from the Eztaxon. Phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining method (Tamura et al., 2007). Topology of the phylogenetic trees was evaluated by bootstrap resampling method with 1000 replicates and trees were rooted with *Actinomadura hibisca* JCM 9627^T (AF163115) as the out-group.

Enzymatic activities: For urease activities, urea broth (Peptone 1g, NaCl 5g, K₂HPO₄ 2g, D-Glucose 1g, phenol red 0.2g) was prepared and 20 % stock solution of urea was added (final urea concentration of 2%). Tubes were observed regularly up to 14 days for the production of enzyme. The skimmed milk utilization test used for protease activities. For protease activities, nutrient agar medium was prepared and solution of 5% skimmed milk was autoclaved separately. Each strain was streaked across the plates and incubated for 14 days. The plates were observed daily for clear zone around the growth. The organisms which secrete protease, produce zone of clearance around the growth. For amylase activities, nutrient agar medium was prepared and sterilized by autoclaving with 5% starch solution. Each strain was streaked across the plate and incubated for 14 days. After incubation, the plates were flooded with Gram's iodine and observed for the formation of a clear zone around the growth. For lipase hydrolysis, tween agar (Peptone 10g, NaCl 5g, CaCl₂ 0.1g, Tween-80 10 ml) medium was prepared. Each strain was streaked across the plates and incubated up to 14 days. The plates were observed daily for the deposition of Ca²⁺ ions around the growth.

Result and discussion

Morphological characteristics of strains were observed on different ISP media (Table 1). The color of substrate mycelium and the color of aerial mycelium varied between strains.

The strain N23 showed a poor growth on ISP1, ISP4 media and good growth on ISP2 and ISP7 media. No sporulation was observed on ISP1, ISP4

and ISP5. The strain N24 showed good growth and sporulation on ISP1 and ISP7. No growth and sporulation on ISP2, ISP4, ISP5. No sporulation on ISP2, ISP5. The results of biochemical characterization of strains are summarized in Table 2.

Strain N23 was able to utilize D (+) Galactose, D-mannitol, melezitol, meso-inositol and D (+)

Table 1. Morphological studies of strains on different ISP media

Strains	ISP Medium	Color of substrate mycelium	Color of aerial mycelium	Growth	Sporulation
N23	ISP1	White	White	Poor	No
	ISP2	Grey	Grey	Good	Yes
	ISP4	-	-	Poor	No
	ISP5	White	-	-	No
	ISP7	Dark grey	Dark grey	Good	Yes
N24	ISP1	White	White	Good	Yes
	ISP2	Yellow	White	Moderate	Yes
	ISP4	-	-	-	-
	ISP5	-	-	-	-
	ISP7	Brown	White	Good	Yes

- No growth



Figure 1a. N23 on ISP7 media 1b. N24 on ISP7 media

Table 2. Biochemical characterization of strains

Strains	Utilization of sugars								
	L (+) Arabinose	D (+) Galactose	D (+) Mannose	D (+) Xylose	Meso- inositol	D (+) Glucose	Raffinose	D-mannitol	Melezitol
N23	-	+++	-	-	+++	+++	-/+	+++	+++
<i>Streptomyces shaanxiensis</i> DSM 42094	N/A	+++	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	+++	N/A
N24	+++	-	+/-	-	+	+++	-	+++	+++
<i>Streptomyces wuyuanensis</i> FX61T (JX010725)	+++	+++	N/A	+++	+++	N/A	-	N/A	

+++ Good activity, ++ Moderate activity, +Low activity, -No activity, N/A -No data

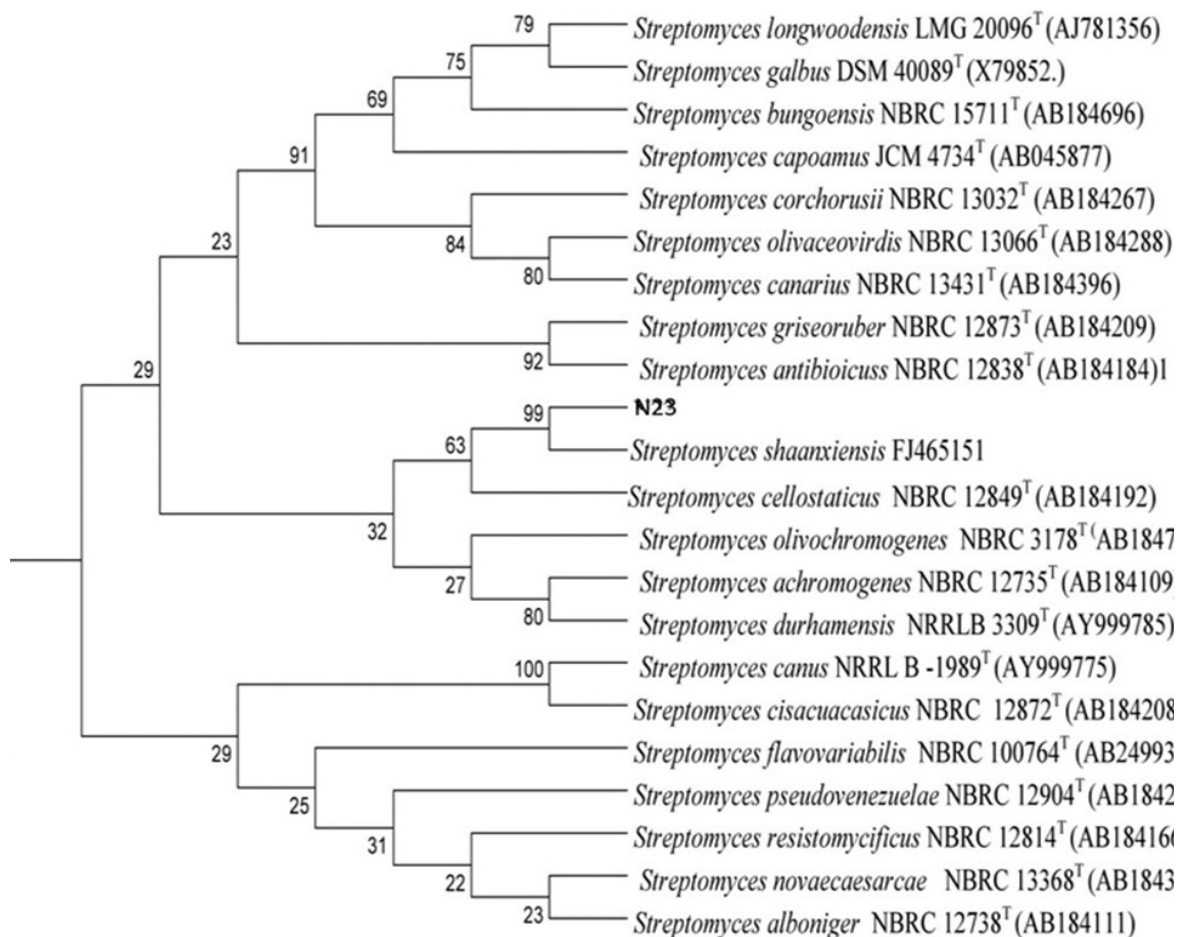


Figure 2. Rooted neighbor joining tree of strain N23 based 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between strain N23 and related representative species of the genus *Streptomyces*. The sequence of the 16S rRNA gene of *Actinomadura hibisca* JCM 9627T, (AF163115) was used as an outgroup

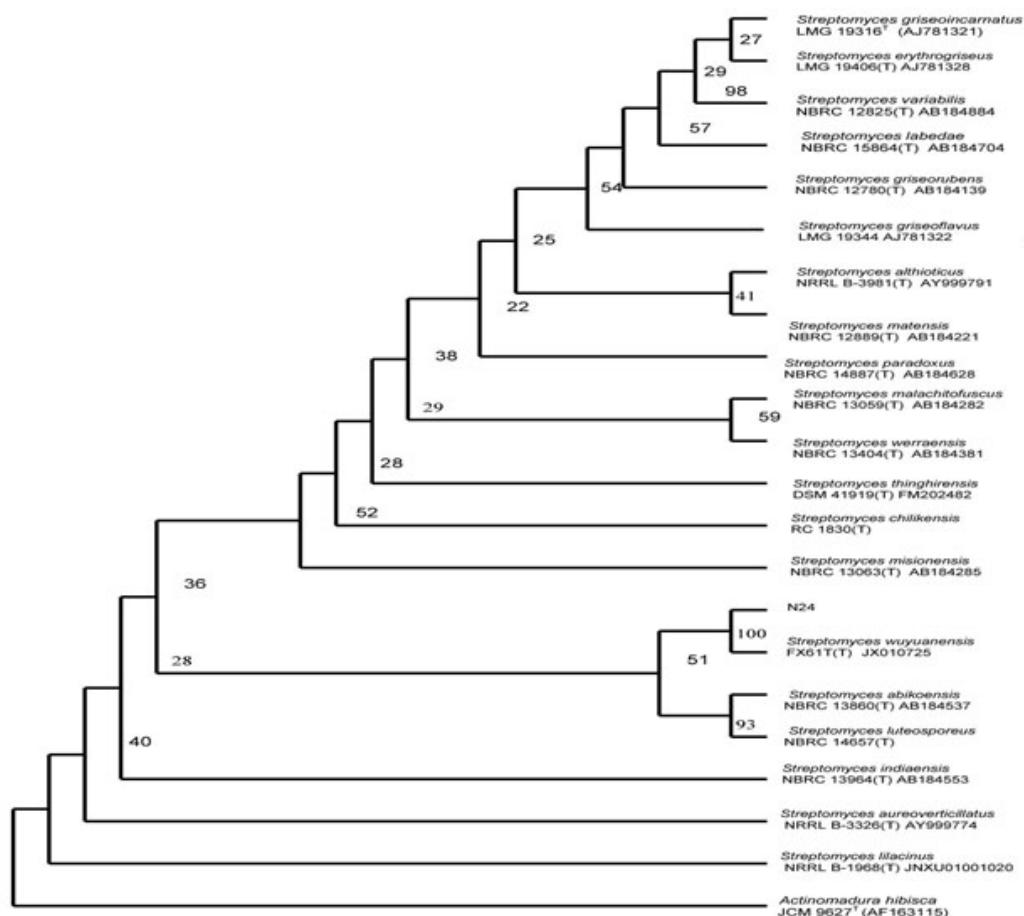


Figure 3. Rooted neighbor joining tree of strain N24 based 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between strain N24 and related representative species of the genus *Streptomyces*. The sequence of the 16S rRNA gene of *Actinomadura hibisca* JCM 9627T, (AF163115) was used as an outgroup

Glucose but did not utilize L (+) Arabinose, D (+) Mannose and D (+) Xylose, utilize Raffinose weakly. Strain N24 was able to utilize L (+) Arabinose, D-mannitol, melezitole and D (+) Glucose but did not utilize D (+) Galactose, D (+) Xylose and Raffinose. N24 utilize D (+) Mannose moderately.

Phylogenetic analysis

The 16S rRNA genes of related sequences were retrieved from Eztaxon database. Sequences have been chosen as reference sequences in which unidentified and unpublished sequences were not included.

The 16S rRNA genes sequence of 1416 nucleotides were generated for N23 and compared to the validly

Table 3. Enzymatic activities of actinomycetes strains

Actino- -mycetes	Enzymatic activities			
	Amylase	Urease	lipase	Protease
N23	+++	+++	-	-
N24	+++	+++	+++	++

+++ Good activity, ++ Moderate activity, - No activity

described species of genus *Streptomyces* as closest neighbors. Phylogenetic analysis revealed that the strain N23 has highest the 16S rRNA similarity of 100% with *Streptomyces shaanxiensis* CCNWHQ 0031(T) FJ465151.

16S rRNA gene sequence of 1403 nucleotides was generated for N24 and compared to the validly described species of genus *Streptomyces* as

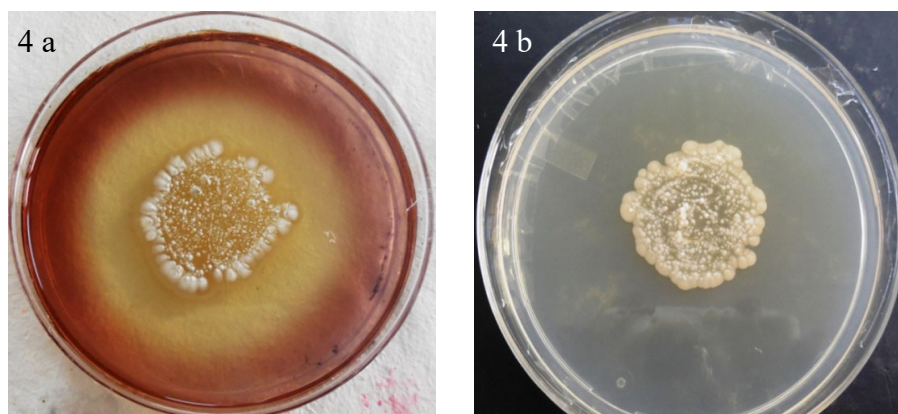


Figure 4a. Amylase activity 4b. Lipase activity

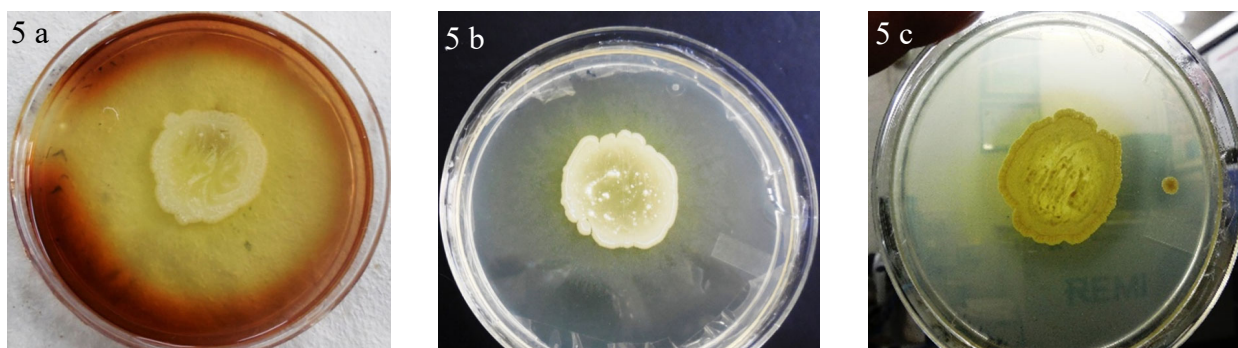


Figure 5a. Amylase activity 5b. Lipase activity 5c. Proteinase activity

closest neighbors. Phylogenetic analysis revealed that the strain N22 has the highest 16S rRNA similarity of 100% with *Streptomyces wuyuanensis* FX61T(T) (JX010725).

In the screening for enzyme activity, strain N23 had capability to degrade amylase and urease. The strain N24 showed good amylase activity, urease activity, lipase activity, and protease activities respectively, which may indicate a need for further technological studies.

Previously, the type strain *Streptomyces shaanxiensis* CCNWHQ 0031^T reported amylase activities but gelatinase activities were not observed [14]. However, the strain N23 showed good amylase and urease activities. The type strain *Streptomyces wuyuanensis* possessed catalase, gelatinase and urease activities [15]. The strain N24 showed good enzymatic activities with the enzyme amylase, urease, lipase, and protease activities, respectively. This study indicates that these actinomycetes isolates had good enzymatic activities which may serve as enzyme-producing

actinomycetes for biotechnological applications.

Acknowledgements

The research work was supported by grants from Centre for Science & Technology of the Non-Aligned and Other Developing Countries (NAM S&T) funded by Department of Science and Technology (DST). Infrastructural facilities provided by University of Delhi, Acharya Narendra Dev College and Laboratory of Microbial Synthesis; Institute of Biology are gratefully acknowledged.

References

- [1] Berdy J, *Bioactive microbial metabolites*. J. Antibiot. 58, p1–26, 2005.
- [2] Prakash D, Nawani N, Prakash M, *Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource*. Biomed Res Int, p264020, 2013. Doi:10.1155/2013/264020.
- [3] Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, Tsetseg B, Seki T, *Molecular diversity of actinomycetes from Mongolian soil*. Annual Report of ICBiotech

- International Center for Biotechnology, p223-237, 1998.
- [4] Norovsuren J, Zenova G.M, Tsetseg B, Shil'nikova V.K, *Rare genera of actinomycetes in soils of Mongolia*. Proceedings of the Institute of Biology, 23, p199-204, 2001.
- [5] Norovsuren J, Oborotov G.V, Zenova G.M, Aliev R.A, Zvyagintsev D.G, *Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes*. Biol, 34, p501–507, 2007. [Doi.org/10.1134/S1062359007040140](https://doi.org/10.1134/S1062359007040140).
- [6] Tsetseg B, Kudo T, Daram D, Enkh-Amgalan J, *Preliminary results on isolation of actinomycetes of rare genera from Mongolian soils*. The 10th International Symposium on Biology of Actinomycetes, 1997.
- [7] Tsetseg B and Katsuhiko A, *Diversity and genetic resources of Mongolian microorganisms, Microorganisms in Mongolia – 2014*. Proceedings of the conference dedicated to the 90th anniversary of the late academician T. Puntsag and the 40th anniversary of the Division of Microbiology, p116-133, 2014.
- [8] Цэцэг Б, Дарам Д, *Хөвсгөл, Увс аймгийн хөрснөөс янз бүрийн аргаар ялгасан актиномицетүүдийн антагонист чанар ба Amycolatopsis төрлийн өсгөврүүдийг зориулалт праймерыг ашиглан тодорхойлсон дүн*, Биологийн хүрээлэнгийн эрдэм шинжилгээний хүрээлэн, № 31, 2015 он.
- [9] Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand Ts, Igarashi M, Sawa R, Nihei C, Nishikawa Y, *Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing Streptomyces species from Mongolian soils*. Parasitology International, 74, 2020. [Doi: 10.1016/j.parint.2019.101961](https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101961).
- [10] Ara I, Yamamura H, Tsetseg B, *Actinoplanes toevensis sp. nov. and Actinoplanes tereljensis sp. nov., isolated from Mongolian soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (60), p919–927, 2010.
- [11] Ara I, Daram D, Tsetseg B, Yamamura H, Hozzein W.N, Bakir M.A, Suto M, Ando K, *Isolation, classification phylogenetic analysis and scanning electron microscopy of halophilic, halotolerant and alkaliphilic actinomycetes isolated from hypersaline soil*. Afr. J. Microbiol. Res, (7), p298–308, 2013. [Doi.org/10.5897/AJMR12.498](https://doi.org/10.5897/AJMR12.498).
- [12] Oyunbileg N, Iizaka Y, Hamada M, Davaasurev B, Fukumoto A, Tsetseg B, Kato F, Tamura F, Batkhuy J, Anzai Y, *Actinocatenispora comari sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from aerial parts of Comarum salesowianum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 71, p004861 2021. [Doi: 10.1099/ijsem.0.004861](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004861).
- [13] Цэцэг Б, *Монгол орны бичил биетний олон янз, генетик нөөц, түүнийг биотехнологид ашиглах боломж ба хэтийн төлөв, Биотехнологийн хөгжил ба генетик нөөцийн ашиглалт, Онол практикийн бага хурлын эмхтгэл*, 2018.
- [14] Zhang X.F, Zhang J, Zheng J, Xin D, Xin Y, Pang H, *Streptomyces wuyuanensis sp. nov., an actinomycete from soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, p2945–2950, 2013.
- [15] Lin Y.B, Wang X. Y, Fang H, Tang M, Wei G. H, *Streptomyces shaanxiensis sp. nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, p1725–1730, 2012.



Газар тариалангийн хөрснөөс ялгасан актиномицетийн ферментийн идэвхийн судалгаа

Балдоржийн Пагмадулам*, Пүрэвжавын Сайнбилэг, Хандаагийн Оюухан,
Цэрэннадмидын Рэнцэнханд

Шинжлэх Ухааны Академи, Биологийн хүрээлэн, Микробын нийлэгжлийн лаборатори
Хүлээн авсан 2021.7.14; Хянан тохиолдуулсан 2021.10.8; Зөвшөөрсөн 2021.11.1

Хураангуй

Төв аймгийн нутаг дах газар тариалангийн хөрснөөс ялгасан N23, N24 дугаартай актиномицетийн өсгөврүүдэд филогенетикийн анализ хийж, амилаза, липаза, уреаза болон протеаза ферментийн идэвхийг тодорхойлов. Өсгөврүүдийн морфологийн шинж чанарыг ISP тэжээлт орчинд өсгөвөрлөж, субстрат мицелийн өнгө, агаарын мицелийн өнгө, спор үүсэлтийг тодорхойлов. 16S rPHX генийн нуклеотидын дарааллыг тогтоож, филогенетикийн анализ хийхэд N23 өсгөвөр нь *Streptomyces shaanxiensis* CCNWHQ 0031(T) FJ465151 омогтой 100% төстэй учир *Streptomyces shaanxiensis*, N24 өсгөвөр нь *Streptomyces wuyuanensis* FX61T(T) (JX010725) омогтой 98.1% төстэй учир *Streptomyces wuyuanensis* төрөл зүйлд хамаарч байгааг тодорхойлов. N23 өсгөврийн ферментийн идэвхийг тодорхойлоход амилаза болон уреаза ферментийн өндөр идэвхтэй байна. N24 өсгөвөр нь амилаза, липаза, уреаза болон протеаза ферментийн өндөр идэвхтэй байгаа нь цаашид хүнс, хөдөө аж ахуй болон хөрсний нөхөн сэргээлтэнд ашиглах боломжтой нь харагдаж байна.

Түлхүүр үгс: Актиномицет, 16S rPHX ген, хөрс, филогенетик, фермент

Оршил

Бичил биетнүүд нь биологийн идэвхт нэгдлүүд, антибиотик, фермент болон витаминь гол нийлэгжүүлэгчид юм. Бичил биетний гаралтай 23,000 орчим биологийн идэвхт нэгдэл бүртгэгдсэн байгаагаас актиномицетийн *streptomyces* sp. төрлүүд нь ойролцоогоор 7600 төрлийн биологийн идэвхт нэгдэл болон антибиотик нийлэгжүүлдэг байна [1]. Сүүлийн жилүүдэд шинэ болон антибиотикт тэсвэртэй өвчлөл нэмэгдэж байгаагаас төрөл бүрийн эх үүсвэрээс биологийн идэвхт метаболит, фермент болон антибиотик нийлэгжүүлэгч актиномицетүүдийг илрүүлэх ажил эрчимтэй хийгдэж байна.

Актиномицетүүд нь утаслаг, Грам -ээрэг,

Actinobacteria-ийн хүрээнд багтдаг, хөрсний микрофлорт голлох байр суурийг эзэлдэг ба хөрс, усны экосистемд өргөн тархсан бичил биетэн юм.

Актиномицетүүд нь үйлдвэрлэлийн ач холбогдолтой олон төрлийн ферментүүд нийлэгжүүлдэг ба целлюлаза, липаза, ксилоза, пектиназа, амилаза болон бусад актиномицетийн гаралтай ферментүүдийг хүнс хөдөө аж ахуй, хөнгөн үйлдвэрлэл, байгаль орчны нөхөн сэргээлтэнд өргөнөөр ашиглаж байна [2].

Манай оронд 1990-ээд оноос актиномицетийн судалгааг эхлүүлэн ховор төрөл, зүйлийн актиномицетүүдийг илрүүлэн, тэдгээрийн биологийн идэвхийн судалгааг эхлүүлсэн байна [3][4][5][6][7]. Б.Цэцэг нарын судлаачид анагаах

*Холбоо барих зохиогч

E-mail address: pagmadulam1028@gmail.com,
pagmadulam_b@ac.mas.mn

ухаанд ач холбогдолтой *Amycolatopsis* -ийн төрлийн актиномицетийг Хөвсгөл болон Увс аймгаас илрүүлэн, тэдгээрийн бактерийн эсрэг идэвхийг судалсан [8]. Б.Пагмадулам нарын судлаачид Монгол орны хөрснөөс ялгасан *streptomyces*-ийн төрлийн актиномицет нь эгэл биет паразитын (*Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*) эсрэг бодис нийлэгжүүлж байгааг тогтоосон байна [9]. Мөн шинжлэх ухаанд шинэ төрөл, зүйл болох магадлалтай өсгөврүүдийг илрүүлэн, актинобактерийн 1 шинэ төрөл, 8 шинэ зүйл илрүүлсэн байна [10][11][12]. Н.Оюунбилэг нарын судлаачид Говь-Алтай аймгийн Хасагт Хайрхан уулнаас цуглуулсан ургамлын дээжнээс *Actinocatenispora comari* sp. nov шинэ зүйлийн актиномицет илрүүлсэн байна [13]. Бид энэхүү судалгааны ажлаар актиномицетийн цэвэр өсгөвөр ялган, ангилалзүйн судалгаа явуулж, ферментийн идэвхийг тодорхойлох зорилго тавилаа.

Судалгааны материал ба аргазүй

Актиномицетийн өсгөвөр ялгах, морфологи, физиологи-биохимийн шинж чанарыг тодорхойлох: Төв аймгийн нутгийн газар тариалангийн хөрснөөс ялгасан актиномицетүүдийг сонгон ангилалзүйн судалгаанд ашиглав. Актиномицетийн эсийн морфологи шинж чанарыг гэрлийн микроскоп ашиглан 40x10 дахин өсгөлтөд тодорхойлсон. Өсгөврийн шинж чанарыг ISP1, ISP2, ISP4, ISP5, ISP7 тэжээлт орчингууд бэлтгэж 28°C-т 10-14 хоног өсгөвөрлөн субстрат мицелийн өнгө, агаарын мицелийн өнгө болон спор үүсэлтийг тодорхойлов. Мөн эдгээр өсгөврүүдийн нүүрс ус ашиглах чадварыг (NH₄)₂SO₄ 1 гр, KCl 0.2 гр, MgSO₄·7H₂O 0.2 гр, бромкрезолын ягаан 0.04% агуулсан тэжээлт орчинд 20% нүүрс усыг бэлтгэн тодорхойлов.

Филогенетикийн анализ: Актиномицетийн өсгөврүүдээс геномын ДНХ ялган, ПГУ-ыг 8F, 1492R, 27F, 1542R праймеруудыг ашиглан полимержих гинжин урвал (ПГУ) явуулж, ПГУ бүтээгдэхүүнийг Qiagen гель ялгах кит ашиглан цэвэршүүлсэн. Micro SeqR 16S rRNA gene sequencing kit (Applied biosystems, USA) болон

Applied Biosystems 3100 Avant™ Genetic Analyzer Sequencer ашиглан 16S pPHX генийн нуклеотидын дарааллыг тогтоож, Sequence Analysis 5.1.1 програм ашиглан боловсруулалт хийсэн. 16S pPHX генийн нуклеотидын дарааллыг ezTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) олон улсын ДНХ-ийн мэдээллийн санд оруулан хайлт хийж, төрөл зүйлийн хамаарлыг тогтоосон. Филогенетикийн модыг ClustalX 1.81 программ ашиглан neighbor-joining аргаар байгуулав.

Ферментийн идэвх тодорхойлох: Уреаза ферментийн идэвхийг тодорхойлоход пептон 1 гр, NaCl 5 гр, K₂HPO₄ 2 гр, глюкоз 1 гр, фенол улаан 0.2 гр агуулсан тэжээлт орчин бэлтгэн 20% мочевины уусмал нэмж ариутгана (эцсийн концентраци 2%). Дээрх тэжээлт орчинд өсгөврөө 14 хоног өсгөвөрлөж, ферментийн идэвхийг шалгана. Протеаза ферментийн идэвхийг тодорхойлохдоо мах пептон агар тэжээлт орчин бэлтгэн 5% тосгүйжүүлсэн сүүг тусад нь ариутгана. Актиномицетийн өсгөврөө 14 хоног өсгөвөрлөсний дараа хүрээ үүсгэлтээр нь үр дүнг тооцно. Амилаза ферментийн идэвхийг мах пептон агар тэжээлт орчин бэлтгэн 5% цардуулын уусмалыг нэмж ариутгана. 14 хоног өсгөвөрлөсний дараа грам иодын уусмал нэмж хүрээ үүсгэлтээр нь үр дүнг тооцно. Липаза ферментийн идэвхийг тогтоохдоо твин 80 агар (Пептон 10 гр, NaCl 1 гр, CaCl₂ 0.1гр, твин-80 10 мл) тэжээлт орчин бэлтгэн, өсгөврөө 14 хоног өсгөвөрлөсний дараа Ca²⁺ ионы тунадас үүсгэлтээр үр дүнг тооцно.

Судалгааны үр дүн, хэлэлцүүлэг

Актиномицетийн N23 болон N24 өсгөврүүдийн морфологийн шинж чанарыг ISP1, ISP2, ISP4, ISP5, ISP7 тэжээлт орчингууд бэлтгэн 28°C-т 10-14 хоног өсгөвөрлөж, субстрат мицелийн өнгө, агаарын мицелийн өнгө болон спор үүсэлтийг тодорхойлон 1-р хүснэгтэд үзүүлэв.

Актиномицетийн N23 болон N23 өсгөврүүдийн нүүрс ус ашиглах чадварыг хэв шинжит өсгөврүүдтэй харьцуулан 2-р хүснэгтэд харуулав.

Актиномицетийн N23 өсгөврийн нүүрс ус ашиглах чадварыг тодорхойлоход инозитол, D- маннитол болон мелицитоз нүүрс усыг ашиглах чадвар сайн байна. N24 өсгөвөр нь L (+) арабиноз, D (+) глюкоз, D- маннитол болон мелицитоза нүүрс ус ашиглах чадвартай байна.

Филогенетикийн судалгааны дүн: N23 болон N24 өсгөврүүдийн 16S рРНХ генийн нуклеотидын дарааллыг тогтоож ezTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) олон улсын ДНХ-ийн мэдээллийн санд оруулан хайлт хийж, төрөл зүйлийн хамаарлыг тогтооход N23 өсгөвөр нь *Streptomyces shaanxiensis* CCNWHQ 0031(T) FJ46515 омогтой 100% төстэй байсан учир *Streptomyces shaanxiensis* зүйл гэж

тодорхойлон 2-р зурагт филогенетикийн модыг байгуулж харуулав.

N24 өсгөвөр нь *Streptomyces wuyuanensis* FX61T(T) (JX010725) омогтой 100% төстэй байсан учир *Streptomyces wuyuanensis* зүйл гэж тодорхойллоо. 3-р зурагт филогенетикийн модыг байгуулж харуулав.

N23 болон N24 актиномицетийн өсгөврүүдийг амилаза, уреаза, липаза болон протеаза ферментийн идэвхийг тодорхойлон 3-р хүснэгтэд харуулав.

Дээрх үр дүнгээс харахад N23 өсгөвөр нь амилаза болон уреаза ферментийн өндөр идэвхтэй байна. Харин N24 өсгөвөр нь амилаза,

1-р хүснэгт. ISP тэжээлт орчингууд дахь өсгөврүүдийн морфологи шинж чанар

Өсгөврийн дугаар	ISP тэжээлт орчин	Субстрат мицеллийн өнгө	Агаарын мицеллийн өнгө	Ургалт	Спор үүсгэлт
N23	ISP1	Цагаан	Цагаан	Сул	-
	ISP2	Саарал	Саарал	Сайн	+
	ISP4	-	-	Сул	-
	ISP5	Цагаан	-	-	-
	ISP7	Гүн саарал	Гүн саарал	Сайн	+
N24	ISP1	Цагаан	Цагаан	Сайн	+
	ISP2	Шар	Цагаан	Дундаж	+
	ISP4	-	-	-	-
	ISP5	-	-	-	-
	ISP7	Хүрэн	Цагаан	Сайн	+

-Ургаагүй

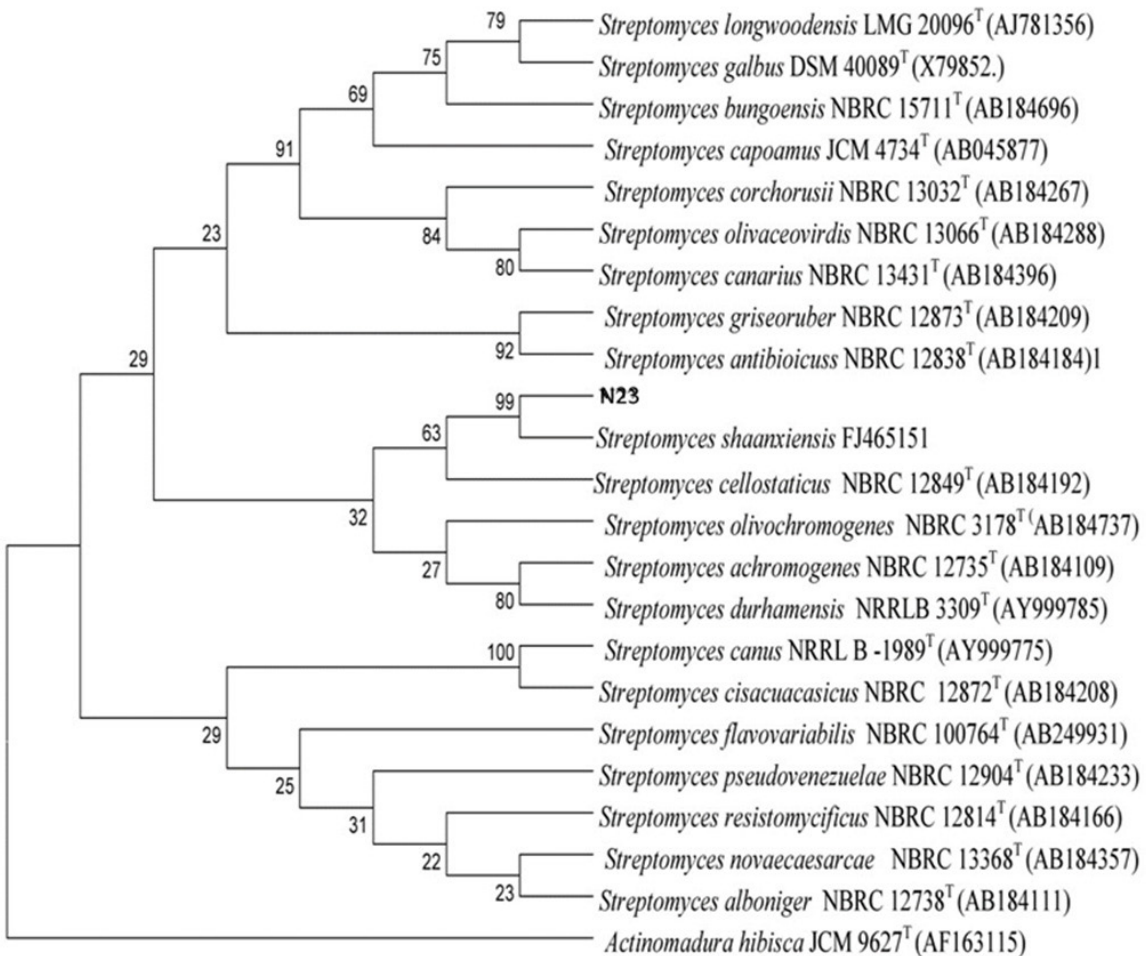


1-р зураг. А. N23 өсгөвөр (ISP 7 тэжээлт орчин) Б. N24 өсгөвөр (ISP 7 тэжээлт орчин)

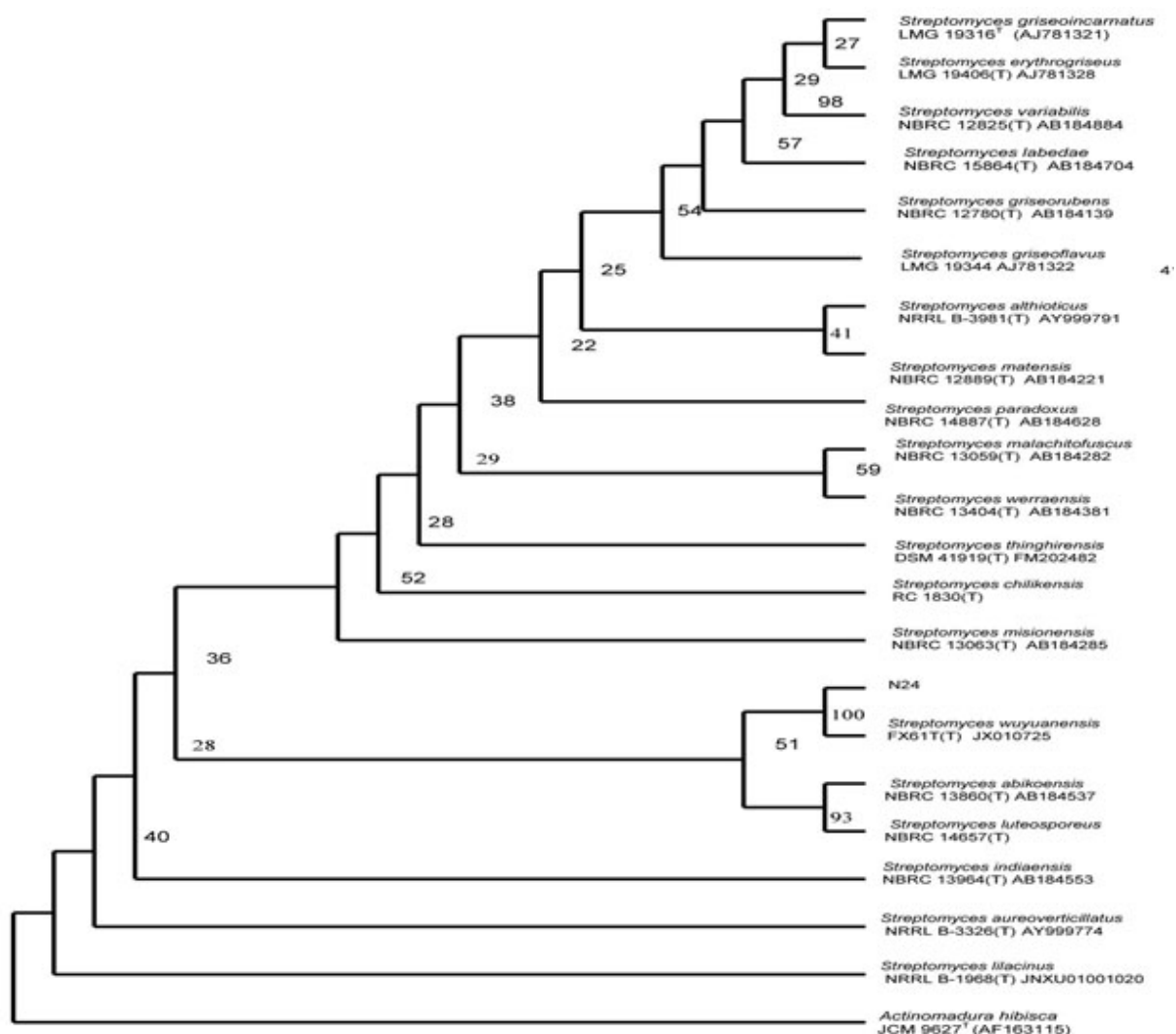
2-р хүснэгт. Нүүрс ус ашиглах чадвар

Өсгөврүүд	Нүүрс ус								
	L (+) Арабиноз	D (+) Галактоз	D (+) Манноз	D (+) Ксилоз	Инозитол	D (+) Глюкоз	Раффиноз	D- Маннитол	Мелицитоз
N23	-	+++	-	-	+++	+++	-/+	+++	+++
<i>Streptomyces shaanxiensis</i> DSM 42094	N/A	+++	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	+++	N/A
N24	+++	-	+/-	-	+	+++	-	+++	+++
<i>Streptomyces wuyuanensis</i> FX61T (JX010725)	+++	+++	N/A	+++	+++	N/A	-	N/A	N/A

+++ ургалт сайн, ++ ургалт дунд зэрэг, + ургалт сул, - ургаагүй, N/A мэдээлэл байхгүй



2-р зураг. N23 өсгөврийн 16S rPHX генийн нуклеотидын дараалал дээр үндэслэсэн филогенетикийн мод



3-р зураг. N24 өсгөврийн 16S rPHX генийн нуклеотидын дараалал дээр үндэслэсэн филогенетикийн мод

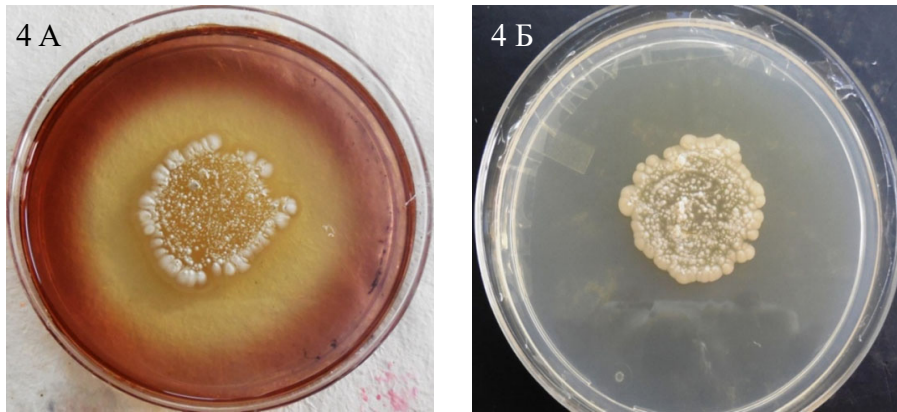
липаза, уреаза болон протеаза ферментийн өндөр идэвхтэй байгаа нь харагдаж байна.

Streptomyces shaanxiensis CCNWHQ 0031^Томог нь амилаза ферментийн идэвхтэй харин желатиназа ферментийн идэвхгүй нь өмнөх судалгаагаар тогтоогдсон байна [14]. Харин Монгол орны газар тариалангийн хөрснөөс ялгасан N23 өсгөврийн ферментийн идэвхийг тодорхойлоход амилаза болон уреаза ферментийн өндөр идэвхтэй байна. Өмнөх судалгаагаар *Streptomyces wuyuanensis* омог нь каталаза, желатиназа болон уреаза ферментийн идэвхтэй байгаа нь тогтоогдсон [15]. Бидний судалгаагаар N24 өсгөвөр нь амилаза, липаза, уреаза болон протеаза ферментийн өндөр

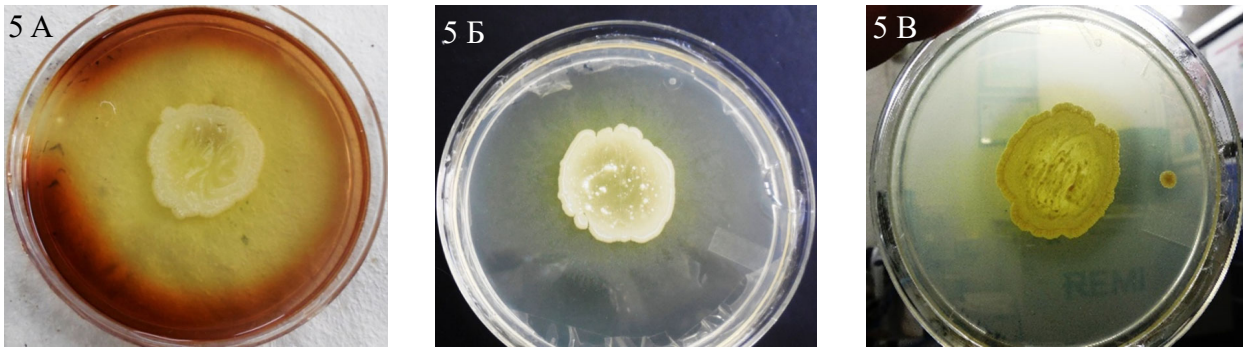
3-р хүснэгт. Ферментийн идэвх

Актиномицетүүд	Ферментийн идэвх			
	Амилаза	Уреаза	Липаза	Протеаза
N23	+++	+++	-	-
N24	+++	+++	+++	++

+++ идэвх өндөр, ++ идэвх сул, - идэвхгүй



4-р зураг. А. Амилазийн идэвх(N23) Б. Липазийн идэвх (N23)



5-р зураг. А. Амилазийн идэвх (N24) Б. Липазийн идэвх (N24) В. Протеазийн идэвх(N24)

идэвхтэй байна. Энэхүү судалгаанд ашигласан актиномицетийн омгуудын ферментийн идэвх өндөр байгаа нь цаашид энэ талын судалгааг үргэлжлүүлэн, хүнс, хөдөө аж ахуй болон байгаль орчны нөхөн сэргээлтэнд ашиглах боломжтой нь харагдаж байна.

Талархал

Тус судалгааг хийхэд санхүүжүүлсэн “Төвийг сахисан болон бусад хөгжиж буй орнуудын шинжлэх ухаан технологийн төв (NAM S&T)” болон БНЭУ-ийн Дэлигийн их сургуулийн харьяа Ачарья Нарендра Дэв коллежийн Микробын технологийн лаборатори, Биологийн хүрээлэнгийн Микробын нийлэгжлийн лабораторийн судлаачдад гүн талархал илэрхийлье.

Эшлэл авсан бүтээл

- [1] Berdy J, *Bioactive microbial metabolites*. J. Antibiot. 58, p1–26, 2005.
- [2] Prakash D, Nawani N, Prakash M, *Actinomycetes: a repertory of green*

catalysts with a potential revenue resource. Biomed Res Int, p264020, 2013. Doi:10.1155/2013/264020.

- [3] Enkh-Amgalan J, Kawasaki H, Tsetseg B, Seki T, *Molecular diversity of actinomycetes from Mongolian soil*. Annual Report of ICBiotech International Center for Biotechnology, p223-237, 1998.
- [4] Norovsuren J, Zenova G.M, Tsetseg B, Shil'nikova V.K, *Rare genera of actinomycetes in soils of Mongolia*. Proceedings of the Institute of Biology, 23, p199-204, 2001.
- [5] Norovsuren J, Oborotov G.V, Zenova G.M, Aliev R.A, Zvyagintsev D.G, *Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes*. Biol, 34, p501–507, 2007. [Doi.org/10.1134/S1062359007040140](https://doi.org/10.1134/S1062359007040140).
- [6] Tsetseg B, Kudo T, Daram D, Enkh-Amgalan J, *Preliminary results on isolation of actinomycetes of rare genera from Mongolian soils*. The 10th International Symposium on

- Biology of Actinomycetes, 1997.
- [7] Tsetseg B and Katsuhiko A, *Diversity and genetic resources of Mongolian microorganisms, Microorganisms in Mongolia – 2014*. Proceedings of the conference dedicated to the 90th anniversary of the late academician T. Puntsag and the 40th anniversary of the Division of Microbiology, p116-133, 2014.
- [8] Цэцэг Б, Дарам Д, Хөвсгөл, Увс аймгийн хөрснөөс янз бүрийн аргаар ялгасан актиномицетүүдийн антагонист чанар ба *Amycolatopsis* төрлийн өсгөврүүдийг зориулалт праймерыг ашиглан тодорхойлсон дүн, Биологийн хүрээлэнгийн эрдэм шинжилгээний хүрээлэн, № 31, 2015 он.
- [9] Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand Ts, Igarashi M, Sawa R, Nihei C, Nishikawa Y, *Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing Streptomyces species from Mongolian soils*. Parasitology International, 74, 2020. Doi: 10.1016/j.parint.2019.101961.
- [10] Ara I, Yamamura H, Tsetseg B, *Actinoplanes toevensis sp. nov. and Actinoplanes tereljensis sp. nov., isolated from Mongolian soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, (60), p919–927, 2010.
- [11] Ara I, Daram D, Tsetseg B, Yamamura H, Hozzein W.N, Bakir M.A, Suto M, Ando K, *Isolation, classification phylogenetic analysis and scanning electron microscopy of halophilic, halotolerant and alkaliphilic actinomycetes isolated from hypersaline soil*. Afr. J. Microbiol. Res, (7), p298–308, 2013. [Doi.org/10.5897/AJMR12.498](https://doi.org/10.5897/AJMR12.498).
- [12] Oyunbileg N, Iizaka Y, Hamada M, Davaasuren B, Fukumoto A, Tsetseg B, Kato F, Tamura F, Batkhuyag J, Anzai Y, *Actinocatenispora comari sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from aerial parts of Comarum salesowianum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 71, p004861 2021. Doi: 10.1099/ijsem.0.004861.
- [13] Цэцэг Б, Монгол орны бичил биетний олон янз, генетик нөөц, түүнийг биотехнологид ашиглах боломж ба хэтийн төлөв, Биотехнологийн хөгжил ба генетик нөөцийн ашиглалт, Онол практикийн бага хурлын эмхтгэл, 2018.
- [14] Zhang X.F, Zhang J, Zheng J, Xin D, Xin Y, Pang H, *Streptomyces wuyuanensis sp. nov., an actinomycete from soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, p2945–2950, 2013.
- [15] Lin Y.B, Wang X. Y, Fang H, Tang M, Wei G. H, *Streptomyces shaanxiensis sp. nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, p1725–1730, 2012.