

МРНТИ: 62.99.39

Ф.К. САРСЕКЕЕВА<sup>1\*</sup>, А.И. ТОКЕН<sup>1</sup>, А.А. СЕРІК<sup>1</sup>, Н.К. ШАКТАЙ<sup>1</sup>,  
Н.Р. АҚМУХАНОВА<sup>1</sup>, С.К. САНДЫБАЕВА<sup>1</sup>, Д.К. КИРБАЕВА<sup>1</sup>, Р. МАММАДОВ<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан  
<sup>2</sup>Университет Муглы Сытки Космана, Мугла, Турция  
\*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

## ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ, ФУНГИЦИДОВ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ РИСОВЫХ ПОЛЕЙ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.05

### Аннотация

Изучено воздействие антибиотиков (ампициллина, тетрациклина, цефтриаксона) и фунгицидов (флуконазола, нистатина) широкого спектра действия, а также ультрафиолетового излучения на культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 и сопутствующие микроорганизмы, выделенные из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.). Ампициллин и тетрациклин в концентрациях 200 мкг/мл и цефтриаксон в концентрации 100 мкг/мл подавляли жизнедеятельность всех цианобактерий и сопутствующих бактерий. Сопутствующие микромицеты подавлялись обоими исследуемыми фунгицидами в концентрации 40 мкг/мл, большинство бактерий – комбинированным препаратом (тетрациклин+фунгицид). Исследуемые штаммы цианобактерий оказались более чувствительны к антибиотикам, чем к фунгицидам. Возможно, это вызвано физиологическим сходством бактерий и цианобактерий, а также их симбиотической взаимосвязью. Облучение культур ультрафиолетовым излучением показало наибольшую чувствительность микроводорослей. При облучении суспензий микроводорослей и цианобактерий УФ–лучами в течение 10-20 минут все клетки микроорганизмов погибали, тогда как 10-15-минутное облучение позволяет избавиться лишь от некоторых неспорозных бактерий.

**Ключевые слова:** микроводоросли, цианобактерии, альголизация почвы, антибиотики, биоудобрения.

В последнее время сельскохозяйственный сектор сталкивается с новыми вызовами по повышению производительности с целью накормить растущее население мира, одновременно уменьшая негативное воздействие на окружающую среду и сохраняя природные ресурсы для будущих поколений. Свой вклад в решение данных проблем могут внести биопрепараты на основе микроводорослей и цианобактерий. Данные микроорганизмы имеют большой потенциал для повышения плодородия почв и стимуляции роста растений [1,2]. Необходимо отметить высокую положительную экологическую роль цианобактерий в почве в качестве азотфиксаторов и накопителей органических веществ [3], широкий спектр адаптации к различным почвенным и гидротермическим условиям [4], ростстимулирующие свойства [5]. Создание биопрепаратов для повышения плодородия почв открывает новые перспективы их использования в агрономии, а также для решения общих задач биотехнологии, где широко используются стабильно работающие микробные сообщества.

Создание и применение биопрепаратов на основе микроводорослей и цианобактерий — наиболее эффективный прием повышения продуктивности растений и качества их урожая, позволяющий сохранять естественное плодородие почв и экологическое равновесие окружающей среды. Их использование дает возможность регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых культур, а также обеспечивать растения азотом, фосфором и другими биоактивными компонентами.

С точки зрения прикладного использования, они экономичны и технологичны, так как их культивирование осуществляется на дешевых питательных средах (без органических соединений и источников минерального азота), а накопление биомассы происходит в короткие сроки даже в экстенсивных культурах, не требующего дорогостоящего оборудования [6].

Следует отметить, что для применения биопрепаратов на посевных полях более эффективно использовать аборигенные штаммы фототрофных микроорганизмов. В связи с этим проведен поиск и выделение культур цианобактерий и микроводорослей из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.) и определен видовой состав альгофлоры исследуемых проб.

Для дальнейших исследований по применению данных штаммов в агробиотехнологии возникает необходимость получения аксеничных культур. Это является сложным процессом, поскольку эти организмы входят в состав консорциумов, включающих, кроме самих цианобактерий и микроводорослей, сопутствующую микрофлору. Существуют методики по очистке водорослей от сопутствующих микроорганизмов с применением методов УФ-излучения, мембранной фильтрации и антибиотиков [6–8]; при этом некоторые водоросли сами обладают фунгицидной и фунгистатической активностью [9]. Однако культуры цианобактерий и микроводорослей весьма специфичны, так как некоторые микроорганизмы могут прочно связываться с их клеточной стенкой или находиться в слизистом чехле (гликокаликсе) цианобактерий, в связи с чем подбор метода очистки является сложной задачей. Отмечено, что развитие этих организмов в аксеничных культурах происходит медленнее и приводит к морфологическим и физиологическим изменениям [7]. Поэтому изучение воздействия различных, отличающихся по механизму и спектру действия антибиотиков и фунгицидов на цианобактерии и микроводоросли для выделения чистых культур, является актуальной задачей. Цель работы – изучение воздействия антибиотиков и фунгицидов, а также ультрафиолетового излучения на рост и развитие цианобактерий и микроводорослей, выделенных из почв рисовых полей Казахстана, для очистки от сопутствующей микрофлоры и получения аксеничных культур. Выделение чистых культур проводили с целью поиска новых штаммов микроводорослей и цианобактерий, характеризующихся высокой скоростью роста и ростстимулирующей активностью по отношению к сельскохозяйственным растениям.

### **Материалы и методы исследования**

Для исследований были использованы штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, выделенные из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.). Из отобранных почвенных проб в лабораторных условиях на соответствующих стандартных питательных средах (BG11, Тамиа, Заррука, L2min) были получены накопительные культуры микроводорослей и цианобактерий.

Анализ на чистоту на питательных средах МПА, Сабуро и LB [10] показал их загрязнение грибной и бактериальной флорой.

В исследовании использовали антибиотики (ампициллин, тетрациклин, цефтриаксон) и фунгициды (флуконазол, нистатин) широкого спектра действия. Отдельные антибиотики, фунгициды и их комбинации добавляли в жидкую питательную среду, разливали в пробирки и вносили исследуемый штамм цианобактерий и микроводорослей. Для контроля использовали минеральную среду без антибиотиков и фунгицидов. Перед посевом в питательную среду с антибиотиками и фунгицидами небольшое количество биомассы цианобактерий и микроводорослей растирали в пробирке для разрушения окружающих колонии слизистых чехлов, с которыми могут быть связаны сопутствующие микроорганизмы и их споры. Штаммы культивировали при дневном освещении в течение 7 суток при комнатной температуре, затем оценивали их рост визуально и под световым

микроскопом. Для проверки на чистоту культуры высевали на свежую питательную среду, и их стерильность определялась путем культивирования на питательной среде LB.

Для выявления роста сопутствующей микрофлоры штаммы после культивирования в среде с антибиотиками и фунгицидами пересевали на картофельный агар с глюкозой (10 г/л).

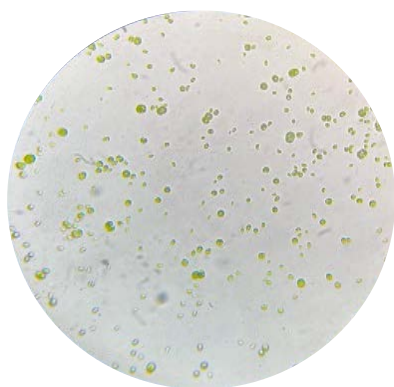
Для изучения влияния УФ-излучений на подавление жизнедеятельности микроорганизмов использовалось стерилизующее действие ультрафиолетовых лучей (254 нм). Культуру цианобактерий на чашках Петри облучали 10–20 минут ультрафиолетовыми лучами. Источником ультрафиолета были бактерицидные лампы БУВ-20, БУВ-40, ПРК-10. Расстояние культуры от источника облучения – 20-30 см. После облучения цианобактерии и микроводоросли высевались на питательный агар, и проводился контроль бактериальной чистоты микроскопическим методом.

### Результаты и обсуждение

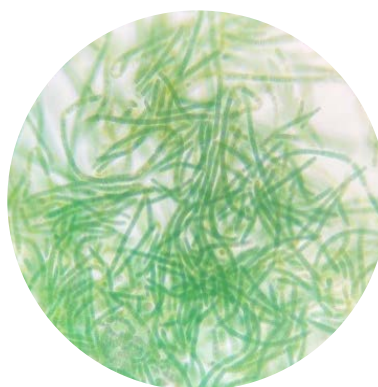
Из почв посевных полей села Бирлик (Алматинской обл.) и села Шиели (Кызылординской обл.) микробиологическими методами выделены альгологически чистые культуры микроводорослей и цианобактерий. Пересевы делали на питательных жидких и агаризованных твердых средах Заррука, BG-11 и Громова на чашках Петри и в пробирках, которые помещали на свет. На «неорганической» минеральной среде при освещении преимущественно выживают культуры цианобактерий и микроводорослей [11]. Из выращенных скоплений микроводорослей и цианобактерий вновь делали пересевы на жидкую питательную среду или скошенный агар. Так как среды использовались селективные, предназначенные для культивирования цианобактерий или микроводорослей, отделить их друг от друга особого труда не составило.

Отдельные чистые культуры были выделены методом «штриха». Микробиологической петлей отбирали небольшое количество образца, которое потом распределяли по поверхности питательной среды. Сначала штрихи содержали большое количество цианобактерий и микроводорослей, однако по мере движения петли, число клеток уменьшалось до одиночных клеток. После посева чашки Петри инкубировали до начала роста колоний.

В результате многократных пересевов получены следующие альгологически чистые культуры микроводорослей: *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 и цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 (рисунок 1).



*Chlorella vulgaris* sp BB-5



*Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11

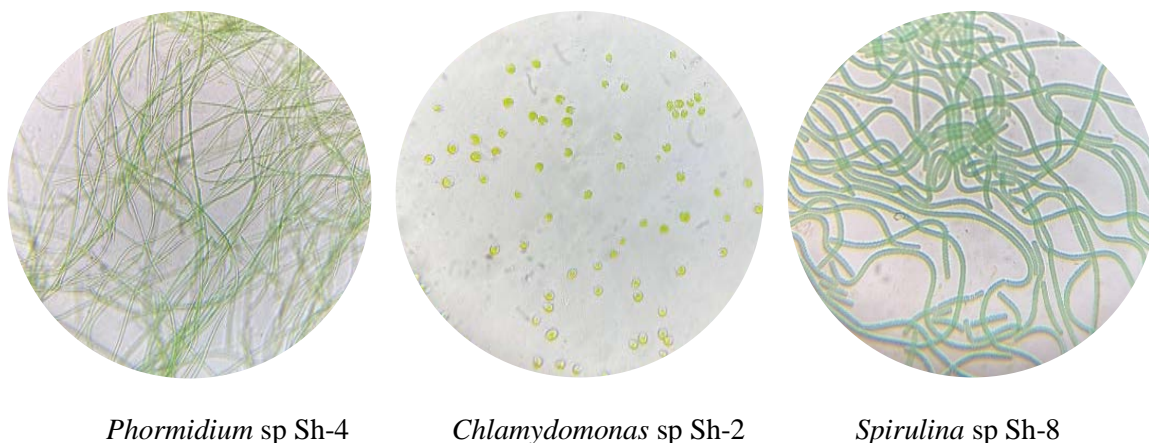


Рисунок 1 - Альгологически чистые культуры цианобактерий и микроводорослей

Антибиотики антибактериального действия- ампициллин, тетрациклин, цефтриаксон, как и ожидалось, не подавляли рост эукариотических микроводорослей, но угнетали жизнедеятельность цианобактерий, а в повышенных дозах вызывали их гибель (таблица 1). Тетрациклин и цефтриаксон в концентрациях 200 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно, полностью разрушали клеточную стенку цианобактерий. При этом не до конца позволяли избавиться от бактериальной флоры. При пересеве на питательные среды рост цианобактерий не происходил, тогда как некоторые виды бактерий при пересеве на питательные среды без антибиотков начинали вновь произрастать. Ампициллин оказал статическое воздействие. Также во всех вариантах грибные колонии полностью развивались.

Далее применяли антибиотик тетрациклин в концентрации 40 мкг/мл в сочетании с фунгицидами - флуконазолом и нистатином (100 мкг/мл), что позволило получить чистые от грибной флоры штаммы микроводорослей и цианобактерий, но с изменением формы микроводоросли *Chlorella vulgaris* sp BB-5 в более продолговатую.

Использование антибиотика цефтриаксона в концентрации 100 мкг/мл позволило получить бактериологически чистые штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2, тогда как концентрация данного антибиотика 40 мкг/мл позволила очистить штаммы цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 от бактериального загрязнения не в полном объеме, а при повышенной концентрации, 100 мкг/мл, наблюдалась гибель клеток самих цианобактерий.

Действие антибиотиков ампициллина и тетрациклина при очистке штаммов микроводорослей и цианобактерий было схожим, концентрация 40 мкг/мл не оказывала никакого влияния на все тестируемые микроорганизмы, концентрация 100 мкг/мл подавляла рост лишь нескольких видов бактерий и производила задержку роста штаммов цианобактерий, тогда как концентрация 200 мкг/мл фиксировала гибель всех клеток бактерий и цианобактерий в том числе.

Таблица 1 – Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, фунгицидам и ультрафиолетовому излучению

Антибиотики, фунгициды (мкг/мл) и УФ-излучение (мин)	Жизнеспособность организмов						
	<i>Chlorella vulgaris</i> sp BB-5	<i>Chlamydomonas</i> sp Sh-2	<i>Oscillatoria pseudogeminate</i> sp BB-11	<i>Phormidium</i> sp Sh-4	<i>Spirulina</i> sp Sh-8	Микромицеты	Бактерии
Контроль (0)	++	++	++	++	++	++	++
Ампициллин (40)	++	++	+	+	+	++	+
Тетрациклин (40)	++	++	+	+	+	++	+
Цефтриаксон (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ампициллин (100)	++	++	+	+	+	++	+
Тетрациклин (100)	++	++	+	+	+	++	+
Цефтриаксон (100)	++	++	-	-	-	++	-
Ампициллин (200)	++	++	-	-	-	++	-
Тетрациклин (200)	++	++	-	-	-	++	-
Тетрациклин (40)+нистатин (40)	+	+	+	+	+	-	+
Тетрациклин (40)+флуконазол (40)	+	+	+	+	+	-	+
УФ- излуч. (10)	+	+	+	+	+	+	+
УФ- излуч. (15)	-	-	+	+	+	-	+
УФ- излуч. (20)	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: микроводоросли и цианобактерии: ++ – рост активный; + – рост сдержанный; – – гибель организма; микромицеты и бактерии: ++ – более 10 КОЕ в чашке Петри; + – менее 10 КОЕ в чашке Петри; – – организм отсутствует

Фунгициды (флуконазол и нистатин) способствовали очищению штаммов микроводорослей и цианобактерий от грибов уже при концентрации 40 мкг/мл. Использование данных фунгицидов в составе с антибиотиком тетрациклином в концентрации 40 мкг/мл позволило получить очищенные от грибов штаммы микроводорослей и цианобактерий. Применение только фунгицидных препаратов привело бы к обратному эффекту – увеличению числа колоний бактерий. Возможно, это вызвано тем, что при использовании антибиотика или фунгицида часть микрофлоры уничтожалась, и начинали активно развиваться бактерии или микромицеты, занимая освободившуюся экологическую нишу [12].

Облучение ультрафиолетом (с длиной волны 254 нм и интенсивностью 40 эрг/мм<sup>2</sup>) показало, что 15-минутное облучение выдержали только цианобактерии, рост микроводорослей уже после 10-минутного облучения сильно замедлялся, а при пересеве на свежие питательные среды микроводоросли переставали размножаться и погибали. Эти результаты показывают высокую устойчивость цианобактерий к физико-химическим факторам внешней среды.

У штаммов микроводорослей и цианобактерий, выживших после воздействия антибиотиков, фунгицидов и ультрафиолетового облучения, определяли наличие сопутствующей микрофлоры. У микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2 после обработки антибиотиком цефтриаксоном в концентрации 100 мкг/мл и фунгицидом в концентрации 40 мкг/мл сопутствующей микрофлоры не обнаружено, тогда как после всех видов воздействия выжившие штаммы цианобактерий *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 содержали бактерии, но преимущественно одного вида.

### Заключение

Таким образом выявлены наиболее эффективные концентрации действия антибиотиков, фунгицидов и ультрафиолетового облучения для получения аксеничных культур микроводорослей и цианобактерий, выделенных из почв посевных полей РК. При обработке антибиотиком цефтриаксоном в концентрации 100 мкг/мл и фунгицидом в концентрации 40 мкг/мл удалось получить аксеничные штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* sp BB-5 и *Chlamydomonas* sp Sh-2. При использовании ультрафиолетового облучения не удалось получить бактериологически чистые культуры, так как при облучении суспензий микроводорослей и цианобактерий УФ-лучами в течение 10–20 минут все клетки микроорганизмов погибали, тогда как 10–15-минутное облучение позволяет избавиться лишь от некоторых неспорозных бактерий.

### Финансирование

Исследование проводилось в рамках прехтов по теме: ИРН AP13068051 «Разработка технологии получения биопрепаратов на основе штаммов микроводорослей и цианобактерий для повышения урожайности сельскохозяйственных растений» и AP14870201 «Поиск и изучение новых вторичных метаболитов цианобактерий перспективных для использования в сельскохозяйственной биотехнологии», финансируемым МНВО РК.

### Литература:

- 1 Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. Вып. 20 С. 120-133 ([http://nbuv.gov.ua/j-pdf/eco00\\_2009\\_1\\_19](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/eco00_2009_1_19))
- 2 Лукьянов В.А., Стифеев А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе. Монография. Курск. 2014 ([https://microalgae.ru/f/prikladnye\\_aspekty\\_primeneniya\\_mikrovodoroslej\\_v\\_agrocenozah.pdf](https://microalgae.ru/f/prikladnye_aspekty_primeneniya_mikrovodoroslej_v_agrocenozah.pdf))
- 3 Доброжан С.Н., Шалару В.В., Шалару В.М., Стратулат И.И., Семенюк Е.Н. Использование некоторых видов синезеленых азотфиксирующих водорослей в качестве биологического удобрения. Альгология. 2014. Т.24 №3. С.426-479. (<http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/81419>)
- 4 Акшинцев, А. А., Баренбойм, Г. М., Кириченко, В. Е., Никитина, В. Н., & Чернягина, О. А. (2016). Экстремальные природные воды и их биота: цианобактерии некоторых гидротерм Камчатки. *ВОДА: ХИМИЯ И ЭКОЛОГИЯ*, (1), 43-52. (<http://elibrary.ru/item.asp?id=26696965>)
- 5 Al-Shakankery, F. M., Hamouda, R. A. and Ammar, M. M. (2014). The promotive effect of different concentrations of marine algae as bio fertilizers on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) plants. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4, 43201-43211.

([https://www.researchgate.net/publication/265126114\\_The\\_promotive\\_effect\\_of\\_different\\_concentration\\_s\\_of\\_marine\\_algae\\_as\\_biofertilizers\\_on\\_growth\\_and\\_yield\\_of\\_maize\\_Zea\\_Mays\\_L\\_plants](https://www.researchgate.net/publication/265126114_The_promotive_effect_of_different_concentration_s_of_marine_algae_as_biofertilizers_on_growth_and_yield_of_maize_Zea_Mays_L_plants))

6 С.Н. Сейлбек, М. Тортай, Н.Р. Акмуханова, Ф.К. Сарсекеева, Д.К. Кирбаева, Н.Е. Бидағулова, Н.А. Алтыбаева, А.Б. Еламанова. Ақдала егіс алқаптарының микробалдырлар биоалуантүрлілігі және бактерияларға қарсы белсенділігі бар цианобактерияларды бөліп алу. Микробиология және вирусология. №1 (40), 2023. – 201-220 б. (DOI: 10.537290/MV-AS.2023.01.14)

7 Rezanka T., Dembitsky V. M. Folia Microbiol. 2006. Vol. 51. Pp. 159–182. (DOI: 10.1007/BF02931419)

8 Zhubanova A. A., Ernazarova A. K., Kaiyrmanova G. K., Zayadan B. K., Savitskaya I. S., Abdieva G. Zh., Kistaubaeva A. S., Akimbekov N. Sh., Fiziologiya rastenii. 2013. Vol. 60. No. 4. Pp. 588–595. (DOI:10.1134/S1021443713040183)

9 Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N. i dr. Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniya vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. Kiev: Naukova dumka, 1975.

10 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М: Изд-во МГУ, 1976. - С.56-124. (<https://microbius.ru/library/n-s-egorov-rukovodstvo-k-prakticheskim-zanyatiyam-po-mikrobiologii>)

11 Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. - Москва: Научный мир, 2012. - 184 с. ([https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley\\_d372e24aa4c.html](https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley_d372e24aa4c.html))

12 Е. Ю. Егупова, В. Б. Багмет, Ш. Р. Абдуллин. ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ И ФУНГИЦИДОВ НА ЦИАНОБАКТЕРИЮ NOSTOC PUNCTIFORME (KUTZ.) HARIOT И СОПУТСТВУЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ. Вестник Башкирского университета. 2017. Т. 22. №1. Стр 86-89. (<https://cyberleninka.ru/article/n/vozdeystvie-antibiotikov-i-fungitsidov-na-tsiyanobakteriyu-nostoc-punctiforme-kutz-hariot-i-soputstvuyuschie-mikroorganizmy>)

Ф.К. САРСЕКЕЕВА<sup>1\*</sup>, А.И. ТӨКЕН<sup>1</sup>, А.А. СЕРІК<sup>1</sup>, Н.К. ШАКТАЙ<sup>1</sup>,  
Н.Р. АКМУХАНОВА<sup>1</sup>, С.К. САНДЫБАЕВА<sup>1</sup>, Д.К. КИРБАЕВА<sup>1</sup>, Р. МАММАДОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

<sup>2</sup>Мугла Ситки Кочман Университеті, Мугла, Түркия

\*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

## АНТИБИОТИКТЕРДІҢ, ФУНГИЦИДТЕРДІҢ ЖӘНЕ УЛЬТРАКҮЛГІН СӘУЛЕЛЕРДІҢ КҮРІШ АЛҚАПТАРЫНЫҢ ТОПЫРАҒЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН МИКРОБАЛДЫРЛАР МЕН ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ДАҚЫЛДАРЫНА ӘСЕРІ

### Түйін

Кең спектрлі антибиотиктердің (ампицилин, тетрациклин, цефтриаксон) және фунгицидтердің (флуконазол, нистатин), сондай-ақ ультракүлгін сәулеленуінің Бірлік ауылының (Алматы облысы) және Шиелі ауылының (Қызылорда облысы) егіс алқаптарының топырағынан бөлінген *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 микробалдырлар дақылдарына және *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 цианобактерияларына, ілеспе микроорганизмдеріне әсері зерттелді. Зерттелген антибиотиктердің ампицилин, тетрациклин, 200 мкг/мл және цефтриаксонның 100 мкг/мл концентрациясы барлық цианобактериялар мен ілеспе бактериялардың тіршілік әрекетін тежеді. Ілеспе микромицеттердің өсуі, концентрациясы 40 мкг/мл болатын екі зерттелетін фунгицидпен, бактериялардың көпшілігінің өсуі құрамдастырылған препаратпен (тетрациклин + фунгицид) тежелді. Цианобактериялардың зерттелген штамдары фунгицидтерге қарағанда антибиотиктерге сезімтал екендігі дәлелденді. Бұл бактериялар мен цианобактериялардың физиологиялық ұқсастығынан, сондай-ақ олардың симбиотикалық байланысынан туындауы мүмкін. Дақылдарды ультракүлгін сәулемен сәулелендіру микробалдырлардың ең жоғары сезімталдығын көрсетті, сондықтан микробалдырлар мен цианобактериялардың суспензиясын ультракүлгін сәулелермен 10-20 минут

сәулелендіру кезінде микроорганизмдердің барлық жасушалары өлді, ал 10-15 минуттық сәулелену тек кейбір спорасыз бактериялардан арылуға мүмкіндік береді.

**Кілтті сөздер:** микробалдырлар, цианобактериялар, топырақтың алголизациясы, антибиотиктер, биотыңайтқыш.

IRSTI: 62.99.39

F.K. SARSEKEYEVA<sup>1\*</sup>, A.I. TOKEN<sup>1</sup>, A.A. SERIK<sup>1</sup>, N.K. SHAKTAY<sup>1</sup>,  
N.R. AKMUKHANOVA<sup>1</sup>, S.K. SANDYBAYEVA<sup>1</sup>, D.K. KIRBAYEVA<sup>1</sup>, R. MAMMADOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup>Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

\*e-mail: fariza.sarsekeyeva@kaznu.edu.kz

## THE EFFECT OF ANTIBIOTICS, FUNGICIDES AND ULTRAVIOLET RADIATION ON CULTURES OF MICROALGAE AND CYANOBACTERIA ISOLATED FROM THE SOIL OF RICE FIELDS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.05

### Abstract

The effect of broad-spectrum antibiotics (ampicillin, tetracycline, ceftriaxone) and fungicides (fluconazole, nystatin), as well as ultraviolet radiation on microalgae cultures *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8, *Phormidium* sp Sh-4 and concomitant microorganisms isolated from the soil of the sown fields of Birlik village (Almaty region) and Shieli village (Kyzylorda region) was studied. The concentrations of the studied antibiotics ampicillin, tetracycline, 200 µg/ml and ceftriaxone 100 µg/ml suppressed the vital activity of all cyanobacteria and concomitant bacteria. Concomitant micromycetes were suppressed by both studied fungicides at a concentration of 40 µg/ml, most bacteria were suppressed by a combined preparation (tetracycline + fungicide). The studied strains of cyanobacteria were more sensitive to antibiotics than to fungicides. Perhaps this is caused by the physiological similarity of bacteria and cyanobacteria, as well as their symbiotic relationship. Irradiation of cultures with ultraviolet radiation showed the greatest sensitivity of microalgae, so when irradiating a suspension of microalgae and cyanobacteria with UV rays for 10-20 minutes, all microorganism cells died, whereas 10-15 minute irradiation allows us to get rid of only some non-spore-bearing bacteria.

**Keywords:** microalgae, cyanobacteria, soil algalization, antibiotics, biofertilizer.

Recently, the agricultural sector has been facing new challenges to increase productivity in order to feed a growing world population, while reducing environmental impact and preserving natural resources for future generations. Biological preparations based on microalgae and cyanobacteria can contribute to solving these problems. These microorganisms have great potential for increasing soil fertility and stimulating plant growth [1, 2]. It should be noted about the high positive ecological role of cyanobacteria in the soil as nitrogen fixers, organic matter accumulators [3] and a wide range of adaptation to various soil and hydrothermal conditions [4], but it is also important to note their growth stimulating abilities [5]. The creation of new biological preparations to increase soil fertility opens up new prospects for the use of microbial preparations in agronomy and, with a high probability, can be used to solve general problems of biotechnology, where there is a need for stable microbial communities.

The creation and application of biopreparations based on microalgae and cyanobacteria is the most effective method for increasing plant productivity and the quality of their harvest, allowing for the preservation of the natural fertility of soils and the ecological balance of the environment. Their use makes it possible to regulate the number and activity of beneficial microflora in the rhizosphere of cultivated crops, as well as to provide plants with nitrogen, phosphorus and other bioactive components.



From the point of view of applied use, they are technologically advanced, which includes cheap cultivation media (the absence of organic compounds and mineral nitrogen sources in the medium) and the rapid accumulation of biomass even in extensive cultures that do not require expensive equipment [6].

It should be noted that it is more efficient to use native strains of phototrophic microorganisms for the use of biological preparations in sown fields. In this regard, a search and isolation of cyanobacteria and microalgae cultures from the soil of the sown fields of the Birlik village (Almaty region) and the Shieli village (Kyzylorda region) was carried out. Soil samples were selected and the species composition of the studied samples algoflora was determined in order to isolate strains of cyanobacteria and microalgae.

For further research on the use of these strains in agricultural biotechnology, there is a need to obtain axenic cultures. This is a complex process, since these organisms form consortiums that include concomitant microflora, in addition to the cyanobacteria and microalgae themselves. There are methods for cleaning algae from concomitant microorganisms using UV radiation, membrane filtration, and antibiotics [6–8], while some algae themselves have fungicidal and fungistatic activity [9]. However, cyanobacteria and microalgae cultures are very specific, since some microorganisms can firmly bind to their cell wall or be located in the mucous membrane (glycocalyx) of cyanobacteria, and therefore the selection of a purification method is a difficult task. It was noted that the development of these organisms in axenic cultures is slower and leads to morphological and physiological changes [7]. Therefore, the study of the effect of various antibiotics and fungicides that differ in the mechanism and spectrum of action on cyanobacteria and microalgae for the isolation of pure cultures is an urgent task. The aim of the work is to study the effects of antibiotics and fungicides, as well as ultraviolet radiation on the growth and development of cyanobacteria and microalgae isolated from the rice fields of the Republic of Kazakhstan for purification from the concomitant microflora and obtaining axenic cultures. The pure cultures were isolated in order to search for new strains of microalgae and cyanobacteria, characterized by a high growth rate and growth-stimulating activity in relation to agricultural plants.

### Materials and methods of research

The microalgae strains *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Spirulina* sp Sh-8 isolated from the soil of the sown fields of Birlik village (Almaty region) and Shieli village (Kyzylorda region) were used for research. Enrichment cultures of microalgae and cyanobacteria were obtained from selected soil samples in laboratory conditions on the appropriate standard nutrient media (BG11, Tamia, Zarruka, L2min).

Analysis for purity from bacterial and fungal contamination on nutrient media MPA, Sabur and LB [10] showed their contamination with fungal and bacterial flora.

Broad-spectrum antibiotics (ampicillin, tetracycline, ceftriaxone) and fungicides (fluconazole, nystatin) were used in the study. Individual antibiotics, fungicides, and their combinations were added to a liquid nutrient medium, poured into test tubes, and the investigated strain of cyanobacteria and microalgae was added. For control, a mineral medium without antibiotics and fungicides was used. Before sowing cyanobacteria and microalgae in the medium with antibiotics and fungicides, a small amount of biomass was triturated in a test tube to destroy the mucous membranes surrounding the colonies, which may be associated with concomitant microorganisms and their spores. The strains were cultivated in daylight for 7 days at room temperature, then their growth was assessed visually and under a light microscope. To check for purity, the cultures were plated on a fresh nutrient medium and their sterility was determined by cultivation on LB nutrient medium.

To detect the growth of concomitant microflora, after cultivation in the medium with antibiotics and fungicides, the strains were transplanted onto potato agar with glucose (10 g/l).

To study the effect of UV radiation on the suppression of the vital activity of microorganisms, the sterilizing effect of ultraviolet rays (254 nm) was used. The cyanobacterial culture on the dishes was irradiated for 10-20 minutes with ultraviolet rays. The bactericidal lamps BUV-20, BUV-40, PRK-10 were the source of ultraviolet. The distance of the culture from the source of irradiation is 20-30 cm. After irradiation, cyanobacteria and microalgae were seeded on agar, and the bacterial purity was controlled by a microscopic method.

### Results and discussion

Algologically pure cultures of microalgae and cyanobacteria were isolated by microbiological methods from the soils of sown fields of the Birlik village (Almaty region) and the Shieli village (Kyzylorda region). Reseeding were done on liquid and agar solid media of Zarruk, BG-11, and Gromov on Petri dishes and in test tubes, which were placed on light. Cyanobacteria and microalgae cultures predominantly survive in an “inorganic” mineral medium under illumination [11]. From the grown accumulations of microalgae and cyanobacteria, the reseeded was carried out again to a liquid medium or a slant agar. Since the media were selective, intended for the cultivation of cyanobacteria or microalgae, it was not difficult to separate them from each other.

Separate pure cultures were isolated by the "stroke" method. A small amount of the sample was selected with a microbiological loop, which was then distributed over the surface of the medium. At first, the strokes contained a large number of cyanobacteria and microalgae, however, as the loop moved, the number of cells decreased to single cells. After inoculation, the plates were incubated until the colonies began to grow.

As a result of multiple reseedings, the following algologically pure cultures of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5, *Chlamydomonas* sp Sh-2 and cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 were obtained (Figure 1).

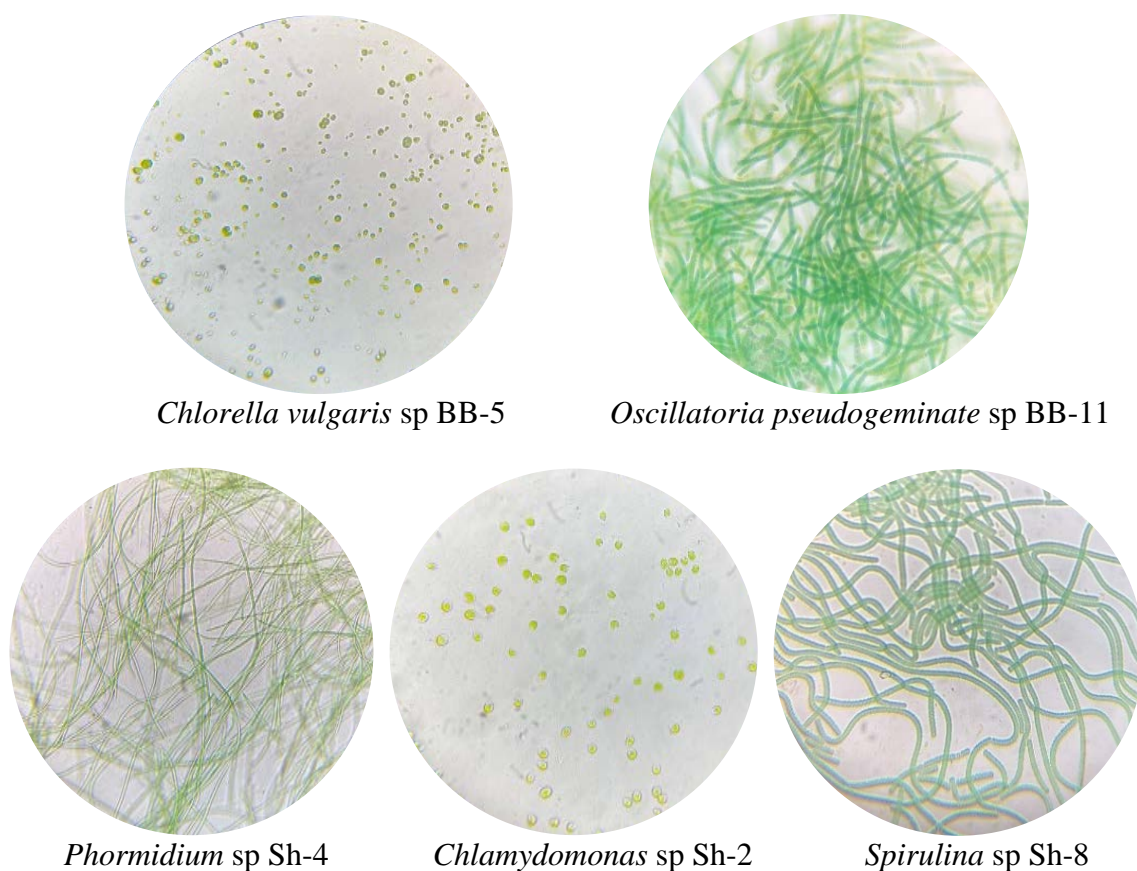


Figure 1 - Algologically pure cultures of cyanobacteria and microalgae

Antibacterial antibiotics – ampicillin, tetracycline, ceftriaxone, as expected, did not suppress the growth of eukaryotic microalgae, but suppressed the vital activity of cyanobacteria, and in high doses caused their death (table 1). Tetracycline and ceftriaxone at concentrations of 200 µg/ml and 100 µg/ml, respectively, completely destroyed the cyanobacterial cell wall. At the same time, it did not completely allow to get rid of the bacterial flora. When transferred to nutrient media, cyanobacteria did not grow, whereas some types of bacteria, when transferred to nutrient media without antibiotics, began to grow again. Ampicillin had a statistical effect. Also, in all variants, fungal colonies have fully developed.

Next, the antibiotic tetracycline was used at a concentration of 40 µg/ml in combination with the fungicides fluconazole and nystatin of 100 µg/ml, which made it possible to obtain pure strains of microalgae and cyanobacteria from the fungal flora, but it should be noted the change in shape into the more oblong microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5.

The use of the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml allowed to obtain bacteriologically pure strains of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2, while the concentration of this antibiotic of 40 µg/ml did not allow to purify the strains of cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 from bacterial contamination in full, and at an increased concentration of 100 µg/ml, the death of the cyanobacterial cells themselves was observed.

The action of the ampicillin and tetracycline antibiotics in the purification of microalgae and cyanobacteria strains was similar, at a concentration of 40 µg/ml it had no effect on all tested microorganisms, at a concentration of 100 µg/ml, the growth of only a few bacterial species was inhibited and the growth of cyanobacteria strains was delayed, while at - 200 µg/ml, the death of all bacterial cells, including cyanobacteria, was recorded.

Table 1-Resistance of microorganisms to antibiotics, fungicides and ultraviolet radiation

Antibiotics, fungicides (µg/ml) and UV radiation (min)	Viability of organisms						
	<i>Chlorella vulgaris</i> sp BB-5	<i>Chlamydomonas</i> sp Sh-2	<i>Oscillatoria pseudogeminate</i> sp BB-11	<i>Phormidium</i> sp Sh-4	<i>Spirulina</i> sp Sh-8	Micromycetes	Bacteria
1	2	3	4	5	6	7	8
Control (0)	++	++	++	++	++	++	++
Ampicillin (40)	++	++	+	+	+	++	+
Tetracycline (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ceftriaxone (40)	++	++	+	+	+	++	+
Ampicillin (100)	++	++	+	+	+	++	+
Tetracycline (100)	++	++	+	+	+	++	+
Ceftriaxone (100)	++	++	-	-	-	++	-
Ampicillin (200)	++	++	-	-	-	++	-
Tetracycline (200)	++	++	-	-	-	++	-
Tetracycline (40)+nystatin (40)	+	+	+	+	+	-	+

Table 1 continued

1	2	3	4	5	6	7	8
Tetracycline (40)+ fluconazole (40)	+	+	+	+	+	-	+
UV radiation (10)	+	+	+	+	+	+	+
UV radiation (15)	-	-	+	+	+	-	+
UV radiation (20)	-	-	-	-	-	-	-

Note: microalgae and cyanobacteria: ++ – active growth; + – restrained growth,; - - the death of the organism; micromycetes and bacteria: ++ - more than 10 CFU in a Petri dish; + - less than 10 CFUs in a Petri dish; - - the organism is missing

Fungicides (fluconazole and nystatin) contributed to the purification of microalgae and cyanobacteria strains from fungi already at a concentration of 40 µg/ml. The use of these fungicides in combination with the antibiotic tetracycline at a concentration of 40 µg/ml made it possible to obtain strains of microalgae and cyanobacteria purified from fungi. The application of only fungicidal preparations would lead to the opposite effect - an increase in the number of bacterial colonies. Perhaps this is due to the fact that when using an antibiotic or fungicide, part of the microflora was destroyed, and bacteria or micromycetes began to actively develop, occupying the vacated ecological niche [12].

Ultraviolet irradiation (with a wavelength of 254 nm and an intensity of 40 erg/mm<sup>2</sup>) showed that only cyanobacteria withstood 15 minutes of radiation, the growth of microalgae was significantly slowed down after 10 minutes of radiation, and when transferred to fresh nutrient media, they ceased to multiply and died. These results show the high resistance of cyanobacteria to physical and chemical environmental factors.

The presence of concomitant microflora in strains of microalgae and cyanobacteria that survived after exposure to antibiotics, fungicides, and ultraviolet irradiation, was determined. In microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2, after treatment with the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml and fungicide at a concentration of 40 µg/ml, concomitant microflora was not found. Whereas, after all exposures, the surviving strains of cyanobacteria *Oscillatoria pseudogeminate* sp BB-11, *Phormidium* sp Sh-4, *Spirulina* sp Sh-8 contained bacteria, but predominantly of the same species.

### Conclusion

Thus, the most effective concentrations of the action of antibiotics, fungicides and ultraviolet irradiation for obtaining axenic cultures of microalgae and cyanobacteria isolated from the sowing fields of the Republic of Kazakhstan were identified. When treating with the antibiotic ceftriaxone at a concentration of 100 µg/ml and fungicide at a concentration of 40 µg/ml, it was possible to obtain axenic strains of microalgae *Chlorella vulgaris* sp BB-5 and *Chlamydomonas* sp Sh-2. When using ultraviolet irradiation, it was not possible to obtain bacteriologically pure cultures, since when a suspension of microalgae and cyanobacteria was irradiated with UV rays for 10-20 minutes, all cells of microorganisms died, while 10-15 minute irradiation allows us to get rid of only some non-spore-bearing bacteria.

### Funding

The study was conducted within the framework of the project on the topic: IRN AP13068051 "Development of technology for obtaining biological preparations based on strains of microalgae and cyanobacteria to increase the yield of agricultural plants" and AP14870201 "Search and study

of new secondary metabolites of cyanobacteria promising for use in agricultural biotechnology", funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

### References:

- 1 Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslei – obitatelei vodnyh ekosistem. Ekosistemy, ih optimizatsiya i ohrana. 2009. Vyp. 20 S. 120-133 ([http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ecooo\\_2009\\_1\\_19](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ecooo_2009_1_19))
- 2 Lukanov V.A., Stifeev A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslei v agrosenoze. Monografiya. Kursk. 2014 ([https://microalgae.ru/f/prikladnye\\_aspekty\\_primeneniya\\_mikrovodoroslej\\_v\\_agrocenozah.pdf](https://microalgae.ru/f/prikladnye_aspekty_primeneniya_mikrovodoroslej_v_agrocenozah.pdf))
- 3 Dobrojan S.N., Shalaru V.V., Shalaru V.M., Stratulat I.I., Semenuk E.N. Ispolzovanie nekotoryh vidov sinezelenykh azotfiksiruiushih vodoroslei v kachestve biologicheskogo udobrenia. Algologia. 2014. T.24 №3. S.426-479. (<http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/81419>)
- 4 Akshincev, A. A., Barenboim, G. M., Kirichenko, V. E., Nikitina, V. N., & Chernagina, O. A. (2016). Ekstremalnye prirodnye vody i ih biota: tsianobakterii nekotorykh gidroterm Kamchatki. VODA: HIMIA I EKOLOGIA, (1), 43-52. (<http://elibrary.ru/item.asp?id=26696965>)
- 5 Al-Shakankery, F. M., Hamouda, R. A. and Ammar, M. M. (2014). The promotive effect of different concentrations of marine algae as bio fertilizers on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) plants. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4, 43201-43211. ([https://www.researchgate.net/publication/265126114\\_The\\_promotive\\_effect\\_of\\_different\\_concentrations\\_of\\_marine\\_algae\\_as\\_biofertilizers\\_on\\_growth\\_and\\_yield\\_of\\_maize\\_Zea\\_Mays\\_L\\_plants](https://www.researchgate.net/publication/265126114_The_promotive_effect_of_different_concentrations_of_marine_algae_as_biofertilizers_on_growth_and_yield_of_maize_Zea_Mays_L_plants))
- 6 S.N. Seilbek, M. Tortai, N.R. Akmuhanova, F.K. Sarsekeeva, D.K. Kirbaeva, N.E. Bidagulova, N.A. Altybaeva, A.B. Elamanova. Aqdala egis alqaptarynyn mikrobaldyrlar bioaluanturliligi jane bakterialarga qarsy belsendiligi bar tsianobakterialardy bolip alu. Mikrobiologia jane virusologia. №1 (40), 2023. – 201-220 b. (DOI: 10.537290/MV-AS.2023.01.14)
- 7 Rezanka T., Dembitsky V. M. Folia Microbiol. 2006. Vol. 51. Pp. 159–182. (DOI: 10.1007/BF02931419)
- 8 Zhubanova A. A., Ernazarova A. K., Kaiyrmanova G. K., Zayadan B. K., Savitskaya I. S., Abdieva G. Zh., Kistaubaeva A. S., Akimbekov N. Sh., Fiziologiya rastenii. 2013. Vol. 60. No. 4. Pp. 588–595. (DOI:10.1134/S1021443713040183)
- 9 Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N. i dr. Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniya vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. Kiev: Naukova dumka, 1975.
- 10 Egorov N.S. Praktikum po mikrobiologii. M: Izd-vo MGU, 1976. - S.56-124. (<https://microbius.ru/library/n-s-egorov-rukovodstvo-k-prakticheskim-zanyatiyam-po-mikrobiologii>)
- 11 Tsoglin L.N., Pronina N.A. Biotehnologiya mikrovodoroslei. - Moskva: Nauchnyi mir, 2012. - 184 s. ([https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley\\_d372e24aa4c.html](https://www.studmed.ru/coglin-l-n-pronina-n-a-biotehnologiya-mikrovodorosley_d372e24aa4c.html))
- 12 Iu. Egupova, V. B. Bagmet, Sh. R. Abdullin. VOZDEYSTVIE ANTIBIOTIKOV I FUNGISIDOV NA TSIANOBAKTERIYU NOSTOC PUNCTIFORME (KUTZ.) HARIOT I SOPUTSTVUIUSCHIE MIKROORGANIZMY. Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2017. T. 22. №1. Str 86-89. (<https://cyberleninka.ru/article/n/vozdeystvie-antibiotikov-i-fungitsidov-na-tcianobakteriyu-nostoc-punctiforme-kutz-hariot-i-soputstvuyuschie-mikroorganizmy>)