



Study of endophytic bacteria isolated from endangered and rare medicinal plants in Mongolia

Nuramkhaan MARJANGUL*^{ORCID}, Erdenetugs ENKHTUGS^{ORCID}, Nyamgerel DARITSOGZOL^{ORCID},
 Jigjiddorj ENKH-AMGALAN^{ORCID}

Laboratory of Microbiology, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: marjanguln@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0003-4676-6610>

Abstract. A total of 41 strains of endophytic bacteria were isolated from 6 species of rare and endangered medicinal plants in Mongolia. Among them, 10 strains produced indole acetic acid (IAA), 8 and 3 strains were positive for phosphate and zinc solubilization, respectively. Out of the strains capable of producing of IAA, and solubilizing phosphate and zinc, the strains P23-R2 and P26-H1, isolated respectively from the root of *Glycyrrhiza uralensis* and aboveground parts of *Cynomorium songaricum*, demonstrated the ability to produce IAA and solubilize phosphate. In addition, the strains P31-F1, and P31-L1, isolated from the flowers and leaves of *Lancea tibetica*, were positive for solubilizing both phosphate and zinc. Besides, the antagonistic activity of the total isolates was tested, and one strain exhibited antagonistic activity against *E. coli*, one against *S. aureus*, two against *B. subtilis*, three strains showed activity against *C. albicans* and one against *A. niger*. The strain P26-H5, isolated from the above part of *Cynomorium songaricum*, exhibited antagonistic activity against 3 test organisms; *E. coli* (18.5 mm), *C. albicans* (10.5 mm), *A. niger* (20.2 mm). A molecular marker was used for the identification of taxonomic relationship of 23 strains capable of producing IAA, phosphate and zinc solubilization, as well as exhibiting antagonistic activity. The result revealed that the strains belonged to 9 distinct genera: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Terribacillus*. The *Klebsiella* sp. P26-H1 resulted the highest production of IAA (28.14 – 68.02 µg/ml), suggesting that it could be used in the future to promote the growth of agricultural plants.

Keywords: endophytic bacteria, identification, rare and endangered medicinal plant, indole acetic acid, antagonistic activity

Received 31 July 2023; received in revised form 04 December 2023; accepted 18 December 2023

© 2023 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

Endophytic bacteria are beneficial microorganisms that promote plant growth either directly or indirectly, under normal and extreme environmental conditions, while residing inside the plant. Direct plant growth promotion involves the production of plant growth-related hormones, and an increase in nutrient availability. Indirectly, endophytic microbes produce antibiotic and lytic enzymes to inhibit the growth of pathogenic organisms, which allows the host plant to remain healthy [1]. Endophytes can mineralize zinc, oxidize sulfur, solubilize phosphorus and potassium, and some endophytes are involved in nitrogen fixation [2]. Therefore, the use of endophytic bacteria that promote plant growth as biofertilizers will help maintain soil morphology/fertility. This eco-friendly approach serves as a cost-effective alternative to chemical fertilizers,

contributing significantly to the advancement of sustainable agriculture. Endophytes-based research is therefore crucial [3].

A study of endophytic microorganisms in Mongolia was initiated in 2009. The results revealed that 73.5% of 83 endophytic fungi isolated from 14 medicinal plant species exhibited antagonistic activity.

Moreover, Enkh-Amgalan *et al.*, extended their identification of endophytic fungal strains to include various other medicinal plants and evaluated their abilities to promote plant growth and alkaloid synthesis [5].

This work aimed to isolate endophytic bacteria from rare and endangered medicinal plants in Mongolia and screening their properties, such as antagonistic activity, synthesis of indole acetic acid, phosphate and zinc solubilization, and identification of isolates.

Materials and methods

Isolation and characterization of endophytic bacteria

Two species (*Peganum harmala* L., *Lancea tibetica*) of endangered, four species (*Cynomorium songaricum*, *Ephedra przewalskii* Stapf., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC., *Paeonia anomala* L.) of rare plant, a total of 6 plants were sampled and used to isolate of endophytic bacteria.

The plant parts, including roots, stems, leaves, and flowers were dried after being sterilized with 70% ethanol for 1-2 minutes, 3% with sodium hypochlorite for 3-5 minutes, followed by another round of 70% ethanol for 0.5-1 minutes. After sterilization, tissue samples were incised into 0.5 x 0.5 sections and placed onto LB agar (casein peptone 10.0g/l, yeast extract 5.0g/l, NaCl 10.0g/l agar 20.0g/l) solid medium containing cycloheximide antibiotics. The plates were then incubated at 28°C and 37°C for 1-7 days to obtain pure cultures of endophytic bacteria [5]. The antagonistic activity of isolated strains was determined against five test organisms: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger*. Using 0.5 McFarland's solution, the bacterial test strains were adjusted to 5x10⁷ cells/ml, yeast to 2x10⁴ cells/ml, and fungi to 2x10⁴ cells/ml and inoculated into LB, YMB and PDB medium, respectively. A 6 mm diameter block was cut from bacterial strains previously cultured for 24 hours, placed onto media with the test organism and incubated at 28°C for 24 hours. The clear zones formed around the blocks were measured, and antagonistic activity was determined by comparison with positive control (kanamycin sulfate 25mg/ml, cycloheximide 20mg/ml) [6]. For screening of IAA production, strains were inoculated into Nutrient broth (NB) medium with tryptophan (0.5%), and without tryptophan. IAA production was visually assessed by color changes induced by Salkowski's reagent and quantified spectrophotometrically at 530 nm. A bright red color of the liquid indicated positive for the production of indole acetic acid, and the amount of IAA was calculated from a standard curve [7]. The Pikovskaya medium supplemented with 0.2% lecithin (glucose 10g/l, Ca₃(PO₄)₂ 2.5g/l, (NH₄)₂SO₄ 0.5g/l, MgSO₄*7H₂O 0.1g/l, NaCl 0.2g/l, KCl 0.2g/l, FeSO₄*7H₂O 0.003g /l, MnSO₄*H₂O 0.003g/l, yeast extract 0.5g/l, agar 18g/l) was used to screen for phosphate solubilization ability. Endophytic bacteria grown on solid nutrient medium (block size 6 mm) were sliced and placed onto Pikovskaya solid medium. The clear zones formed around the strain

were measured to determine phosphate solubility. Zinc solubilization was determined using a similar method but with solid medium containing 0.1% ZnO [8,9].

Identification of endophytic bacteria:

Bacterial genomic DNA was extracted using the "ZanaaspeX; Bacterial DNA Extraction Kit" following the manufacturer's protocol, and the 16S rRNA gene was amplified by PCR using a pair of primers 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCC-3'). PCR was performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) at 95°C for 3 min, (95°C for 30 sec, 55°C for 15 sec, 72°C for 1 min) x 30 cycles, at 72°C for 5 min. PCR products were purified using an Agarose gel DNA extraction kit and sent to Humanizing Genomics Macrogen Inc., Korea, for nucleotide sequencing. The obtained 16S partial sequence were compared to prokaryotic small subunit rDNA sequences using the FASTA search system on the <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <https://www.ezbiocloud.net>. Sequence alignment was performed using MEGA version 4 after multiple alignments of the sequence data with CLUSTAL_X and manual editing. Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method and NJPlot was used to display and analyze the trees.

Results

The information of sampling site and plants used in this study (**table 1**).

A total of 41 endophytic bacteria were isolated from 6 endangered and rare plants collected from the Gobi-Altai, Arkhangai, and Central provinces,

Among these, 6 strains were isolated from both old and fresh rhizomes, and 8 strains were isolated

Table 1. Sampling site and plants information

| No | Sampling site | Sample no. | Name of the plant |
|----|---|------------|---|
| 1 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°11'38") | P23 | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> |
| 2 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°13'12") | P26 | <i>Cynomorium songaricum</i> |
| 3 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°17'50") | P27 | <i>Ephedra przewalskii</i> Stapf [†] |
| 4 | Arkhangai, Tsahir (N47°24'52" E101°45'29") | P31 | <i>Lancea tibetica</i> |
| 5 | Tuv, Bayanchandmani (N48°11'23" E106°21'37") | P32 | <i>Paeonia anomala</i> L. |
| 6 | Gobi-Altai, Tsogt (N44°95'97" E96°75'66") | P35 | <i>Peganum harmala</i> L. |

Table 2. The strains of endophytic bacteria isolated from endangered and rare medicinal plants

| № | Sample no. | Number of isolates | Parts of plants and strain number | | | |
|---|------------|--------------------|--|----------------------|--|--------------------------------|
| | | | Roots | Stems | Flowers | Leaves |
| 1 | P23 | 10 | P23-R1, P23-R2, P23-R3, P23-R4, P23-R5, P23-R6, P23-R7, P23-R8, P23-R9 | P23-S1 | x | x |
| 2 | P27 | 4 | P27-R1 | P27-S1 | x | P27-L1, P27-L2 |
| 3 | P31 | 4 | P31-R1, P31-R2 | x | P31-F1, P31-F2 | - |
| 4 | P32 | 6 | P32-R1, P32-R2 | x | x | P32-L1, P32-L2, P32-L3, P32-L4 |
| 5 | P35 | 2 | x | P35-S1, P35-S2 | x | - |
| 6 | P26 | 14 | Aboveground parts | Underground parts | Fresh rhizome | Old rhizome |
| | | | P26-H1, P26-H2, P26-H3, P26-H4, P26-H5 | P26-R1 P26-R2 P26-R3 | P26-ZN1, P26-ZN2, P26-ZN3, P26-ZN4, P26-ZN5, | P26-ZO1 |

Note: (x) - not available samples; (-) no growth of endophytic bacteria

Table 3. Antagonistic activity of endophytic bacteria

| Name of the plant | Strain no. | The inhibition zone, mm (block's diameter Ø 6 mm) | | | | |
|--|------------|---|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. ex DC. | P23-R6 | - | - | - | 20.2±0.7 | - |
| | P26-H5 | 18.0±0.7 | - | - | 10.5±0.8 | 20.2±0.7 |
| <i>Cynomorium songaricum</i> Rupr. | P26-ZN4 | - | 9.0±0.7 | 13.0±0.7 | - | - |
| | P27-R1 | - | - | 11.0±0.7 | 13.5±0.7 | - |

Note: (-) inactive

from the aboveground parts and underground parts of *Cynomorium songaricum*, and 9 strains were from the roots, with one isolated from the stem *Glycyrrhiza uralensis*. Regarding 4 plants, 5 strains were isolated from the roots, 3 from the stems, 7 from the leaves, and 2 strains from the flowers, respectively (table 2).

The antagonistic activity of endophytic bacterial strains isolated from the aforementioned six plants was determined (table 3). Among them, four strains exhibited antagonistic activity: one strain against *E. coli*, one strain against *S. aureus*, two strains against *B. subtilis*, three strains against *C. albicans*, and one strain against *A. niger*. Specifically, strain P26-H5 isolated from the above part of *Cynomorium songaricum* exhibited antagonistic activity against three test organisms: *E. coli* (18.5 mm), *C. albicans* (10.5 mm), as well as *A. niger* (20.2 mm).

The P23-R6 strain isolated from the root of *Glycyrrhiza uralensis*, showed antagonistic activity against *C. albicans* (20.2 mm). Moreover, strain P26-ZN4 exhibited antagonistic activity against *S. aureus* (10.7 mm) and *B. subtilis* (13.7 mm), while strain P27-R1 was antagonistic against *B. subtilis* (11.7 mm) and *C. albicans* (13.5 mm) (table 3).

Also, the capability to produce indole acetic acid

(IAA), phosphate, and zinc solubilization of these endophytic bacterial strains was tested, and only positive results were summarized in (table 4).

According to the result of the experiment, 10 strains produced indole acetic acid (IAA), while 8 and 3 strains were positive for phosphate and zinc solubilization,

Table 4. The endophytic bacteria capable of synthesizing indole acetic acid and solubilizing phosphate and zinc

| № | Name of the plant | Strain number | | |
|---|-----------------------------------|--|----------------|----------------|
| | | IAA | Phosphate | Zinc |
| 1 | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> | P23-R1, P23-R2, P23-R3, P23-R4, P23-R5, P23-R8 | P23-R2, P23-S2 | - |
| 2 | <i>Cynomorium songaricum</i> | P26-H1, P26-H3, P26-H4 | P26-H1, P26-R1 | P26-ZO1 |
| 3 | <i>Ephedra przewalskii</i> Stapf. | P27-S2 | P27-L3 | - |
| 4 | <i>Lancea tibetica</i> | - | P31-F1, P31-L1 | P31-F1, P31-L1 |
| 5 | <i>Paeonia anomala</i> L. | - | P32-R2 | |

Note: (-) no IAA synthesized, and no solubilization of phosphorus and zinc

respectively (table 4). Among these strains, 6 were isolated from *Glycyrrhiza uralensis*, three strains from *Cynomorium songaricum* and one strain from *Ephedra przewalskii* Stapf, all exhibiting IAA production. Specifically, strains P23-R2 and P26-H1, isolated from the root of *Glycyrrhiza uralensis* and the aboveground parts of *Cynomorium songaricum*, respectively, demonstrated the ability to produce IAA and solubilize phosphate. In addition, strains P31-F1, and P31-L1, isolated from flower and leaves of *Lancea tibetica*, exhibited positive results for both phosphate and zinc solubilization.

Strains P23-R5 and P26-H1, which produced indole



Fig. 1. The positive strains for the production of IAA (red color)

acetic acid selected for further study (Fig. 2). Initially, the P23-R5 and P26-H1 strains were pre-cultured in NB medium for 24 hours on a shaker at 130 rpm. Secondly, 1.0 mL of bacterial strains was inoculated into 100mL of NB medium, both with and without tryptophan. The production of IAA and the growth of bacterial strains were then measured.

The growth of *Klebsiella* sp. P26-H1 in the medium containing tryptophan entered the exponential phase within the first 2 days, reaching the stationary phase by day 3. However, in the tryptophan-free medium, bacteria growth increased significantly starting from 1.5 day

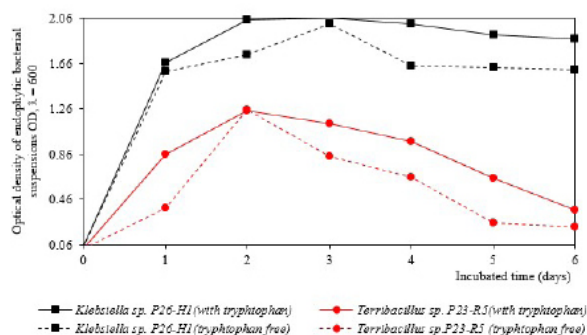


Fig. 2. Growth of endophytic bacterial strains

or 36 hours, decreased from day 3, and shifted to the stationary phase by day 4, and persisting until the end of the experiment. As for *Terribacillus* sp. P23-R5 strain, bacterial growth transitioned from the logarithmic phase to the death phase, preventing the attainment of the stationary phase in the medium containing tryptophan starting from the second day. Conversely, in the absence of tryptophan in the medium, bacterial growth immediately declined without stabilizing on the second day, particularly from the logarithmic phase.

A continuously increasing trend was observed in the amount of IAA produced by *Klebsiella* sp. P26-H1 in the medium with tryptophan. The IAA concentration

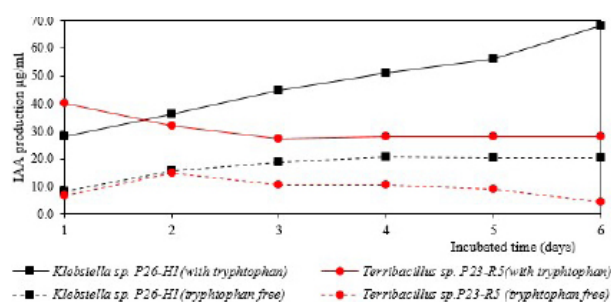


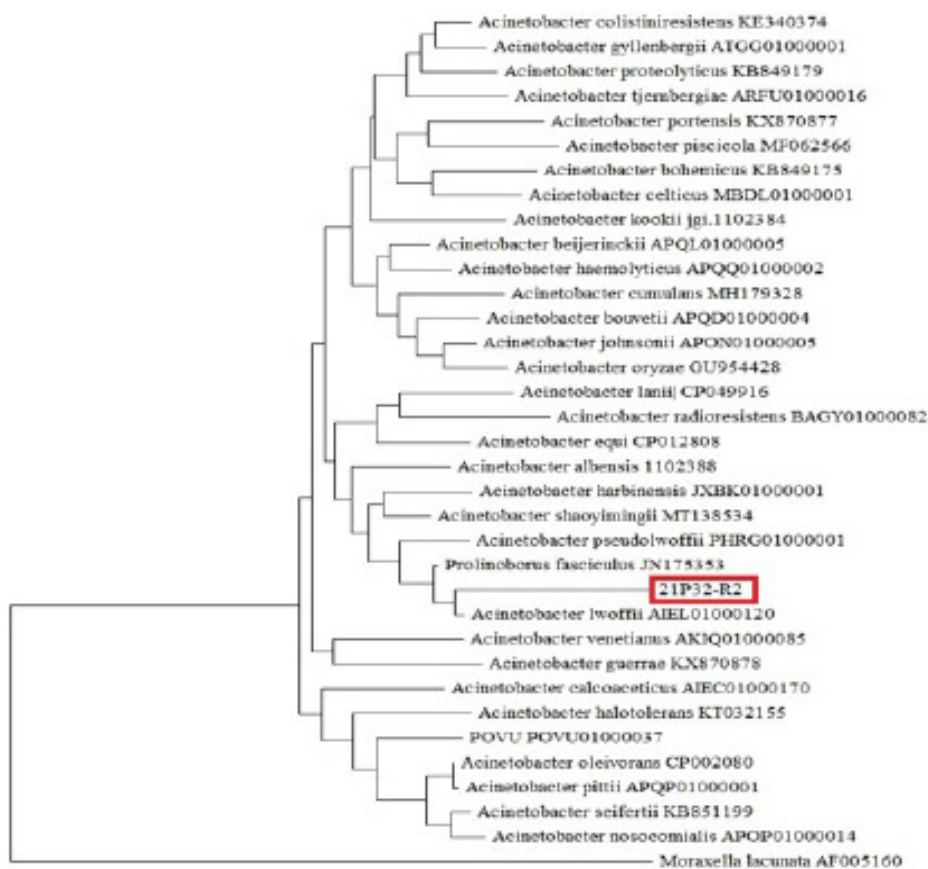
Fig. 3. Quantitative production of IAA by endophytic bacterial strains

measured 28.1 µg/ml after 24 hours of cultivation, increased to 36.1 µg/ml on the second day, further escalated to 44.9 µg/ml on the third day, reached 50.9 µg/ml on the fourth day, surged to 56.2 µg/ml on the fifth day, and peaked at 68.2 µg/ml on the final day of measurement. In contrast, the *Terribacillus* sp. P23-R5 strain exhibited the highest synthesis of indole acetic acid (IAA) at 39.9 µg/ml on the first day. This was followed by a gradual decline to 31.95 µg/ml on the second day. The production of indole acetic acid (IAA) remained consistent at a level of 27.9 µg/ml from the third to the sixth day and eventually ceased. Furthermore, *Klebsiella* sp. P26-H1 in the tryptophan-free medium also consistently produced IAA, although the amount was three times lower than that in the tryptophan-containing medium. The synthesis of indole acetic acid (IAA) was measured at 8.1 µg/ml on the first day, followed by an increase to 15.6 µg/ml on the second day, and further to 18.8 µg/ml on the third day. From the fourth to the sixth days, the synthesis of IAA remained steady at a level of 20.2 µg/ml.

The concentration of indole acetic acid (IAA) produced by the *Terribacillus* sp. P23-R5 strain measured 6.7 µg/ml on the first day and increased to 14.8 µg/ml on the second day. Subsequently, it decreased to 10.8 µg/ml on the third day and continued to decline to 10.0 µg/ml,

Table 5. Endophytic bacterial identification by 16S rRNA

| Name of the plant | Strain no. | The closest genus or species based on 16S rRNA gene sequence | Similarity (%) |
|--|------------|--|----------------|
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. ex DC. | P23-R1 | <i>Paenibacillus terrae</i> | 99.0 |
| | P23-R3 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 100 |
| | P23-R4 | <i>Terribacillus saccharophilus</i> | 99.3 |
| | P23-R5 | <i>Terribacillus saccharophilus</i> | 100 |
| | P23-R6 | <i>Bacillus halotolerans</i> | 100 |
| | P23-R8 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> | 100 |
| | P23-S2 | <i>Bacillus halotolerans</i> | 100 |
| <i>Cynomorium songaricum</i> Rupr. | P26-H1 | <i>Klebsiella michiganensis</i> | 99.9 |
| | P26-H5 | <i>Alcaligenes faecalis</i> | 100 |
| | P26-R1 | <i>Serratia ficaria</i> | 99.8 |
| | P26-ZN2 | <i>Bacillus atrophaeus</i> | 100 |
| | P26-ZN4 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 100 |
| | P26-ZO1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> | 99.9 |
| <i>Ephedra przewalskii</i> Stapf. | P27-R1 | <i>Bacillus mojavenis</i> | 99.8 |
| | P27-L3 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 99.8 |
| | P27-S2 | <i>Bacillus mojavenis</i> | 99.9 |
| <i>Lancea tibetica</i> Hook.f. & Thomson | P31-F2 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 100 |
| <i>Paeonia anomala</i> L. | P32-R2 | <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 98.0 |
| <i>Peganum harmala</i> L. | P35-S2 | <i>Paenibacillus taichungensis</i> | 99.6 |

**Fig. 4.** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of P32-R2 isolates which isolated from *Paeonia anomala* L.

8.8 µg/ml, and 4.3 µg/ml on the fourth, fifth, and sixth days, respectively.

To establish the taxonomic relationships, 23 strains were chosen based on their ability to produce indole acetic acid (IAA), solubilize phosphate and zinc, exhibit antagonistic activity, and display distinct patterns of bacterial colonies. Through this approach, the sequencing of 19 strains was successfully accomplished, leading to the determination of their taxonomic relationships, as outlined in (table 5).

The molecular identification results revealed that 19 bacterial strains belong to 9 distinct genera. 6 strains belonged to the genus *Bacillus*, two strains to the genus *Pseudomonas*, three strains to the genus *Peribacillus*, two strains to the genus *Terribacillus*, two strains to the genus *Paenibacillus*, and the remaining four strains belonged to different genera: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, and *Serratia*. Notably, the six strains isolated from *Cynomorium songaricum* were belonged to 6 different genera.

The 16S rRNA gene sequence similarity of strain P32-R2, isolated from *Paeonia anomala* L., was found to be 98.0% similar to *Acinetobacter lwoffii* (Fig. 4). Nevertheless, in the neighbor-joining tree analysis, a distinct and independent species can be identified.

Discussion

Indole acetic acid, an essential hormone for plant growth, is synthesized by plants and bacteria, whether or not they rely on tryptophan. The findings from this study indicate that when screening for IAA production in a medium lacking tryptophan, the strains still produced IAA, albeit at 2-3 times lower than those in the tryptophan-supplemented medium (Fig. 3). Consistent with the findings from other researchers, *Klebsiella* species have shown greater proficiency in indole acetic acid (IAA) production compared to *Bacillus* and *Enterobacter* species [10]. Among 18 strains isolated from contaminated soil exhibiting IAA synthesis, the *Klebsiella pneumonia* AWD5 strain exhibited the highest IAA production, reaching 95.31 µg/ml in a medium supplemented with glucose [11]. Comprehensive reviews highlight various types of endophytic bacteria, including *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, and *Chryseobacterium*, recognized for their roles in enhancing plant growth [12]. In a study involving 13 endophytic bacterial strains isolated from two medicinal plants, *Fagonia mollis* and *Achillea fragrantissima*, in the Egyptian desert, eight strains were identified as

belonging to *Bacillus*, two to *Paenibacillus*, and three to *Brevibacillus* [13]. Similarly, in another investigation, 116 endophytic bacterial strains from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (licorice) plants in the Xinjiang province, China, were categorized into 20 different genera, with *Bacillus* constituting 65% of the identified genera [14]. *Bacillus subtilis* strains are widely utilized as biocontrol agents. Researchers have identified a strain of *Bacillus mojavensis* that inhibits the mycotoxin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. This species was recently distinguished from the *B. subtilis* group due to its biocontrol capabilities against the endophyte group [15]. In this study, two strains from *Ephedra przewalskii* Stapf were found to be 99.1% and 100% similar to the biocontrol agent *Bacillus mojavensis*. In a separate investigation, 31 strains were isolated from the roots of *Pennisetum glaucum* and the surrounding soil. Among them, 24 strains were identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, one as *Acinetobacter baumannii*, and six as *Acinetobacter* sp., with 26 strains among them exhibiting positive solubilization of phosphate [16]. Furthermore, in this study, one strain (P26-H5) from *Cynomorium songaricum* belonged to the genus *Alcaligenes* and exhibited antagonistic activity against *E. coli*, *C. albicans*, and *A. niger*.

Conclusion

In this research, 41 strains of endophytic bacteria were successfully isolated from endangered and rare medicinal plants in Mongolia. Upon identification, it was revealed that these strains belonged to nine distinct genera: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, and *Terribacillus*. Notably, the presence of *Klebsiella* and *Alcaligenes* genera in Mongolia was documented for the first time. Additionally, the study identified four strains with antagonistic activity, 10 strains capable of producing indole-3-acetic acid (IAA), and eight and three strains proficient in solubilizing phosphate and zinc, respectively. The findings of this study pave the way for future research endeavors, particularly in the development of agricultural production.

Acknowledgments

This research received support from the Mongolian Foundation for Science and Technology (Grant Number: IIIyY₃_2020/01).

References

- [1] I. Afzal, Z.K. Shinwari, S. Sikandar, S. Shahzad,

- Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research.*, 21 pp. 36-49. Apr. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- [2] A. Dahiya, R. Kumar, and S. S. Sindhu, Microbial Endophytes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. *Endophytes: Mineral nutrient management.*, vol. 3, pp. 3–10. May 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_3
- [3] D.K. Maheshwari. S. Dheeman, Endophytes in Mineral Nutrient Management: Introduction. *Endophytes: Mineral nutrient management.*, vol. 3, pp. 35–75. May 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_1
- [4] J. Enkh-Amgalan, M. Amarbayasgalan, T. Adiyadolgor, Endophytic fungi of Mongolian plants: a promising source for bioprospecting. *Proceedings of the conference: Prosperity of biotechnology and utilization of genetic resources*, 2018.06.08. Ulaanbaatar, pp. 97-104, 2018
- [5] J. Enkh-Amgalan, Isolation and antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Mongolia. *Proceedings of Institute of Biology, MAS.*, vol. 29, pp. 35-37, 2013
- [6] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*, vol. 6, pp. 71-79, Apr. 2016, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- [7] SB. Rajini, M. Nandhini, AC. Udayashankar, SR. Niranjana, OS. Lund, HS. Prakash, Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathol.*, vol. 69, pp. 642–654, Jan. 2020, <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>
- [8] P. Vyas, P. Rahi, A. Chauhan, A. Gulati, Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological Research.*, vol. 111, pp. 931-938, Aug. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.003>
- [9] C.M. Senthil Kumar, T.K. Jacob, S. Devasahayam, S. Thomas, C. Geethu, Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Microbiological Research.*, vol. 207, pp. 153–160, March. 2018, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.017>
- [10] M.A. Mowafy, M.M. Fawzy, A. Gebreil, and A. Elsayed, Endophytic *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* enhance the growth and yield of maize. *Soil and plant science.*, vol. 71, pp. 237-246, Feb. 2021, <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1880621>
- [11] J. Rajkumari, L.P. Singha, P.Pandey, Genomic insights of aromatic hydrocarbon degrading *Klebsiella pneumonia* AWD5 with plant growth promoting attributes: a paradigm of soil isolated with elements of biodegradation. *3 Biotech*, Vol. 8, Feb. 2018, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1134-1>
- [12] U.K. Vandana, J. Rajkumari, L.P. Singha, L. Satish, H. Alavilli, P.D.V.N. Sudheer, S. Chauhan, R. Ratnala, V. Satturu, P.B. Mazumder, The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology.*, vol. 10, pp. 101, Feb. 2021, <https://doi.org/10.3390/biology10020101>
- [13] M.D.F. ALKahtani, et al., Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria from Desert Plants and Their Application as Bioinoculants for Sustainable Agriculture, *Agronomy.*, vol. 10, pp. 1325, Sep. 2020, <https://doi.org/10.3390/agronomy10091325>
- [14] L. Li, O.A. A. Mohamad, J. Ma, A.D. Friel, Y. Su, Y. Wang, Z. Musa, Y. Liu, P. Brian Hedlund, L.Wenjun, Synergistic plant–microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F, *Antonie van Leeuwenhoek.*, vol. 111, pp. 1735-1748. Oct. 2018, <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1062-4>
- [15] W.C. Bacon, M.D. Hinton, R.T. Mitchell, E.M. Snook, B. Olubajo, Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control.*, vol. 62, pp. 1-9, Jul. 2012, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.03.006>
- [16] F. Rokhbakhsh-Zamin D. Sachdev N. Kazemi-Pour, A. Engineer, KR. Pardesi, S. Zinjarde, PK. Dhakephalkar, BA. Chopade, Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum.*, *Journal of Microbiology and Biotechnology.* vol. 21(6), pp. 556-66, Jun. 2011, <https://doi.org/10.4014/jmb.1012.12006>
- [17] S. Ray, S. Singh, B.K. Sarma, H.B. Singh, Endophytic *Alcaligenes* isolated from horticultural and medicinal crops promotes growth in Okra (*Abelmoschus esculentus*), *Journal of Plant Growth Regulation.* vol. 35, pp. 401-412, June. 2016, <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9548-z>



Монгол орны нэн ховор, ховор эмийн ургамлаас ялгасан эндофит бактерийн судалгаа

Нурамхаан Маржангүл*^{ORCID}, Эрдэнэтөгс Энхтөгс^{ORCID}, Нямгэрэл Дарьцогзол^{ORCID},
Жигжиддорж Энх-Амгалан^{ORCID}

¹Монгол Улс, Улаанбаатар, Шинжлэх ухааны академи, Биологийн хүрээлэн, Микробиологийн лаборатори

*Холбоо барих зохиогч: marjanguln@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0003-4676-6610>

Хураангуй. Монгол орны нэн ховор, ховор 6 зүйл эмийн ургамлаас эндофит бактерийн 41 өсгөвөр ялган авсан. Эдгээр өсгөврүүдээс 10 өсгөвөр индол цууны хүчил (ИЦХ) нийлэгжүүлж, 8 өсгөвөр фосфат, 3 өсгөвөр цайрыг уусгах чадвартай байв. ИЦХ нийлэгжүүлж, фосфат болон цайр уусгах чадвартай байсан өсгөврүүдээс Урал чихэр өвсний үндэснээс ялгасан P23-R2, Зүүн гарын гоёоны газрын дээд хэсгээс ялган авсан P26-H1 дугаартай өсгөврүүд нь ИЦХ нийлэгжүүлэхээс гадна фосфат уусгах чадвартай байна. Мөн Төвд ланцайны цэцэг болон навчнаас ялгасан P31-F1, P31-L1 өсгөврүүд нь фосфат болон цайрыг уусгах чадвартай байв. Цаашид нийт ялган авсан өсгөврүүдийн антагонист идэвхийг тогтооход *E. coli*-ийн эсрэг 1, *S. aureus*-ийн эсрэг 1, *B. subtilis*-ийн эсрэг 2, *C. albicans*-ийн эсрэг 3, *A. niger*-ийн эсрэг 1 өсгөвөр идэвхтэй байв. Тэдгээрээс Зүүнгарын гоёоны газрын дээд хэсгээс ялган авсан P26-H5 өсгөвөр нь *E. coli* (18.5 мм), *C. albicans* (10.5 мм), *A. niger* (20.2 мм)-ийн эсрэг идэвхтэй байна. ИЦХ нийлэгжүүлж, фосфат, цайр уусгах, чадвартайгаас гадна антагонист идэвхтэй 23 өсгөврийн ангилалзүйн хамаарлыг молекул маркер ашиглан тогтооход *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, болон *Terribacillus* зэрэг нийт 9 өөр өөр төрөлд хамаарагдаж байна. *Klebsiella* sp. P26-H1 өсгөвөр нь хамгийн их буюу 28.14 – 68.02 мкг/мл ИЦХ нийлэгжүүлж байгаа нь цаашид газар тариалангийн ургамлын өсөлтийг дэмжихэд ашиглах боломж буйг харуулж байна.

Түлхүүр үгс: эндофит бактери, тодорхойлох, нэн ховор, ховор эмийн ургамал, индол цууны хүчил, антагонист идэвх

Хүлээн авсан 2023.07.31; хянан тохиолдуулсан 2023.12.04; зөвшөөрсөн 2023.12.18

© 2023 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Оршил

Эндофит бактери ургамлын эрхтэнцэрийн эд, эс дотор байршин өсөж үржин, хүрээлэн буй орчны хэвийн болон эрс тэс нөхцөлд эзэн ургамлын өсөлтийг шууд болон шууд бус замаар дэмждэг ургамалд ашигтай бактери юм. Шууд замаар дэмжих нь хэвийн болон стресстэй нөхцөлд ургамлын өсөлттэй холбоотой гормонуудыг зохицуулах эсвэл ургамлын шим тэжээлийн хүртээмжийг шууд нэмэгдүүлэхийг хэлнэ. Шууд бус гэдэг нь антибиотик болон янз бүрийн фермент нийлэгжүүлэн ургамалд өвчин үүсгэгчийн өсөлтийг дарангуйлан ургамлын дархлааг сайжруулдаг [1]. Эндофитууд цайрыг эрдэсжүүлэх, хүхрийг исэлдүүлэх, фосфор, калийг уусгах чадвартайгаас гадна цөөн тооны эндофитууд агаарын азотыг ашиглах чадвартай байдаг [2]. Иймд

ургамлын өсөлтийг дэмждэг эндофит бактерийг биобордоо болгон ашигласнаар хөрсний хэв шинжийг тогтвортой хадгалахад дэм болдог. Энэ нь цаашид тогтвортой хөдөө аж ахуйг хөгжүүлэхэд химийн бордооны оронд ашиглаж болох байгальд ээлтэй, зардал багатай, илүү ирээдүйтэй хувилбар болох юм. Тиймээс эндофит бактерийн судалгаа нэн чухал байна [3]. Манай оронд эндофит бичил биетний судалгаа анх 2009 онд хийгдэж, Монгол орны 14 зүйл эмийн ургамлаас ялгасан эндофит мөөгөнцрийн 83 өсгөврийн 73.5% нь антагонист идэвхтэй болохыг тогтоосон байна [4]. Цаашид Ж.Энх-Амгалан болон бусад судлаачид өөр хэд хэдэн зүйл эмийн ургамлаас эндофит мөөгөнцрийн өсгөвөр ялган тодорхойлж, тэдгээрийн антагонист болон ферментийн идэвх, ургамлын өсөлтийг дэмжих чадвар, алкалоидын нийлэгжлийг тогтоох зэрэг

ажлуудыг хийж гүйцэтгэсэн байна [5]. Монгол орны нэн ховор болон ховор эмийн ургамлуудаас эндофит бактерийн өсгөвөр ялган авч, антагонист идэвх, ургамлын өсөлтөд нэн шаардлагатай гормон болох ИЦХ-ийг нийлэгжүүлэх, фосфат болон цайр уусгалт зэрэг шинж чанаруудыг тодорхойлж, ангилалзүйн хамаарлыг тогтооход энэхүү судалгааны ажлын зорилго оршино.

Судалгааны материал ба арга зүй

Эндофит бактерийн цэвэр өсгөвөр ялган, ашигт шинж чанаруудыг тодорхойлох

Эгэл өмхий өвс (*Peganum harmala* L.), Төвд ланцай (*Lancea tibetica* Hook.f. & Thomson) 2 зүйл нэн ховор, Зүүнгарын гоёо (*Cynomorium songaricum* Rupr.), Пржевальскийн зээргэнэ (*Ephedra przewalskii* Stapf.), Урал чихэр өвс (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.), Ягаан цээнэ (*Paeonia anomala* L.) 4 зүйл ховор ургамал, нийт 6 зүйл ургамлыг судалгааны материал болгон ашиглалаа.

Дээж ургамлын үндэс, иш, навч, цэцэг зэрэг хэсгүүдийг 70% - ийн этилийн спиртээр 1-2 мин, 3% - ийн натрийн гипохлоридоор 3-5 мин, 70% - ийн этилийн спиртээр дахин 0.5-1 мин ариутган, хатаасны дараа 0.5 x 0.5 см зүсч дотор эдийг ил гаргаад циклогексамид антибиотиктой LB агар (казейн пептон 10.0г/л, дрожжийн ханд 5.0г/л, NaCl 10,0г/л, агар 20г/л) хатуу орчин дээр суулгаж 28°C ба 37°C-д 1-7 хоног өсгөвөрлөн эндофит бактерийн цэвэр өсгөвөр ялган авна [4]. Ялгаж авсан нийт өсгөвөрийг *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* зэрэг тест организмын эсрэг антагонист идэвхийг тогтооно. McFarland 0.5 - ын уусмал ашиглан бактерийн тест өсгөвөрийг 5×10^7 эс/мл, дрожжийг 2×10^4 эс/мл, мөөгөнцрийг 2×10^4 эс/мл байхаар тооцож тэжээлт орчинд тарина. Урьдчилан 24 цаг өсгөвөрлөсөн бактерийн өсгөврөөс 6 мм диаметртэй хэрчим зүсч аваад, тест организмтай хатуу тэжээлийн орчны гадаргууд байрлуулж 28°C - т 24 цаг өсгөвөрлөн, өсгөвөрийн эргэн тойронд үүссэн дарангуйллын хүрээг хэмжиж, эерэг хяналттай (канамицин сульфат 25мг/мл, циклогексимид 20мг/мл) харьцуулан антагонист идэвхийг тодорхойлно [6]. ИЦХ үүсэлтийг 0,5% триптофантай болон триптофангүй Nutrient broth шингэн тэжээлийн орчинд өсгөвөрлөн, өсгөвөрийн шингэн дээр Салковскийн урвалж нэмээд сайтар хольж өрөөний температурт харанхуй нөхцөлд 20 мин байлгана. Шингэний өнгө тод улаан болсон нь ИЦХ үүсэлт эерэг гэж үзнэ. Цаашид үүссэн

ИЦХ-ийн хэмжээг спектрофотометрээр 530 нм - т шингээлтийн утгыг хэмжин урьдчилан байгуулсан жиших муруйнаас ИЦХ-ийн хэмжээг бодож гаргана [7]. 0.2% - ийн лецитинтэй Пиковская (глюкоз 10г/л, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 2.5г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1г/л, NaCl 0.2г/л, KCl 0.2г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003г/л, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.003г/л, дрожжийн ханд 0.5г/л, агар 18г/л) тэжээлт орчинд LB агар хатуу тэжээлийн орчинд урьдчилан ургуулсан эндофит бактерийн өсгөвөрийг (хэрчмийн Ø 6 мм) зүсч, 28°C - д 5-7 хоног өсгөвөрлөн, колонийн эргэн тойронд үүссэн хүрээний диаметрийг хэмжиж фосфат уусгах чадварыг тодорхойлно. Цайр уусгалтыг 0.1% - ийн ZnO бүхий орчинд дээрхийн адил тодорхойлно [8,9].

Эндофит бактерийн 16S рРНХ генийн нуклеотидын дарааллыг тогтоон, төрлийн хамаарлыг тодорхойлох: Бактерийн геномын ДНХ-г “Zanaaspeх; Bacterial DNA Extraction Kit” цомог ашиглан зааврын дагуу ялган, 16S рРНХ генийг 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') болон 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') хос праймер ашиглаж ПГУ - ын аргаар олшруулна. ПГУ-ыг GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem) машинд 95°C-д 3 мин, (95°C-д 30 сек, 55°C-д 15 сек, 72°C-д 1 мин) x 30 цикл, 72°C - д 5 мин нөхцөлөөр явуулна ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг “Agarose gel DNA extraction Kit” цомгийг ашиглан цэвэршүүлж, цэвэршүүлсэн бүтээгдэхүүний нуклеотидын дараалалыг БНСУ-ын “Humanizing Genomics Macrogen Inc” компаниар тодорхойлуулав. 16S рРНХ генийн нуклеотидын дарааллаар хамгийн ойр төрөл зүйлийг <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <https://www.ezbiocloud.net> сайтын мэдээллийн сангаас хайлт хийн ангилал зүйн хамаарлыг тогтоов.

Судалгааны үр дүн

Судалгаанд ашигласан ургамлын дээж авсан газар болон ургамлын мэдээлэл (**1-р хүснэгт**).

Говь-Алтай, Архангай, Төв аймгийн нутаг дэвсгэрээс авсан нэн ховор болон ховор зүйл ургамлын үндэс, иш, навч, цэцэг болон Зүүнгарын гоёо ургамлын газрын дээд, доод, хуучин, шинэ зангилаанаас нийтдээ эндофит бактерийн 41 цэвэр өсгөвөр ялгаж авав (**2-р хүснэгт**).

Зүүнгарын гоёоны шинэ болон хуучин зангилаанаас 6, газрын дээд болон доод хэсгээс 8 өсгөвөр, Урал чихэр өвсний үндэснээс 9, ишнээс 1 өсгөвөр тус тус ялгав. Бусад ургамлын үндэснээс 5, ишнээс 3, навчнаас 7, цэцэгнээс 2 өсгөвөр ялгаж

1-р хүснэгт. Дээж авсан газар болон ургамлын мэдээлэл

| № | Дээж авсан цэг | Дээжийн дугаар | Латин нэр | Монгол нэр |
|---|---|----------------|---|---|
| 1 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°11'38") | P23 | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> | Урал чихэр өвс |
| 2 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°13'12") | P26 | <i>Cynomorium songaricum</i> | Зүүн гарын гоёо |
| 3 | Gobi-Altai, Chandmani (N45°34'43" E98°17'50") | P27 | <i>Ephedra przewalskii</i> Stapf ¹ | Пржевальскийн зээргэнэ (хонин зээргэнэ) |
| 4 | Arkhangai, Tsahir (N47°24'52" E101°45'29") | P31 | <i>Lancea tibetica</i> | Төвд ланцай |
| 5 | Tuv, Bayanchandmani (N48°11'23" E106°21'37") | P32 | <i>Paeonia anomala</i> L. | Ягаан цээнэ |
| 6 | Gobi-Altai, Tsogt (N44°95'97" E96°75'66") | P35 | <i>Peganum harmala</i> L. | Эгэл өмхий өвс |

2-р хүснэгт. Нэн ховор болон ховор эмийн ургамлаас ялгасан эндофит бактерийн өсгөвөр

| № | Дээжийн дугаар | Өсгөврийн тоо | Ургамлын эрхтэн, өсгөврийн дугаар | | | |
|---|----------------|---------------|--|----------------------|--|--------------------------------|
| | | | Үндэс | Иш | Цэцэг | Навч |
| 1 | P23 | 10 | P23-R1, P23-R2, P23-R3, P23-R4, P23-R5, P23-R6, P23-R7, P23-R8, P23-R9 | P23-S1 | х | х |
| 2 | P27 | 4 | P27-R1 | P27-S1 | х | P27-L1, P27-L2 |
| 3 | P31 | 4 | P31-R1, P31-R2 | х | P31-F1, P31-F2 | - |
| 4 | P32 | 6 | P32-R1, P32-R2 | х | х | P32-L1, P32-L2, P32-L3, P32-L4 |
| 5 | P35 | 2 | х | P35-S1, P35-S2 | х | - |
| 6 | P26 | 14 | Газрын дээд хэсэг | Газрын доод хэсэг | Шинэ зангилаа | Хуучин зангилаа |
| | | | P26-H1, P26-H2, P26-H3, P26-H4, P26-H5 | P26-R1 P26-R2 P26-R3 | P26-ZN1, P26-ZN2, P26-ZN3, P26-ZN4, P26-ZN5, | P26-ZO1 |

Тайлбар: (х) - дээж материал аваагүй; (-) эндофит бактери илрээгүй

3-р хүснэгт. Эндофит бактерийн антагонист идэвх

| Ургамлын нэр | Өсгөврийн дугаар | Үүссэн дарангуйллын хүрээ, мм (хэрчмийн Ø 6 мм) | | | | |
|------------------------|------------------|---|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| Урал чихэр өвс | P23-R6 | - | - | - | 20.2±0.7 | - |
| Зүүнгарын гоёо | P26-H5 | 18.0±0.7 | - | - | 10.5±0.8 | 20.2±0.7 |
| | P26-ZN4 | - | 9.0±0.7 | 13.0±0.7 | - | - |
| Пржевальскийн зээргэнэ | P27-R1 | - | - | 11.0±0.7 | 13.5±0.7 | - |

Тайлбар: - идэвхгүй

авав. Дээрх 6 ургамлаас ялгасан эндофит бактерийн өсгөврүүдийн антагонист идэвхийг тогтооход 4 өсгөвөр идэвхтэй байна.

Үүнээс *E. coli*-ийн эсрэг 1, *S. aureus*-ийн эсрэг 1, *B. subtilis*-ийн эсрэг 2, *C. albicans*-ийн эсрэг 3, *A. niger*-ийн эсрэг 1 өсгөвөр идэвхтэй байна. Зүүнгарын гоёоны газрын дээд хэсгээс ялган авсан P26-H5 өсгөвөр нь *E. coli*-ийн эсрэг 18.5 мм, *C. albicans*-ийн эсрэг 10.5 мм, *A. niger*-ийн эсрэг 20.2 мм - ийн хүрээг тус тус

үүсгэж байлаа. Урал чихэр өвсний үндсэнээс ялгасан P23-R6 өсгөвөр зөвхөн *C. albicans* (20.2 мм) - ийн эсрэг идэвхтэй байна. Харин P26-ZN4 дугаартай өсгөвөр *S. aureus* (10.7 мм), *B. subtilis* (13.7 мм) - ийн эсрэг, P27-R1 өсгөвөр *B. subtilis* (11.7 мм), *C. albicans* (13.5 мм) - ийн эсрэг антагонист идэвхтэй байна (**3-р хүснэгт**).

Мөн эдгээр өсгөврүүдийн ИЦХ нийлэгжүүлэх, фосфат болон цайрыг уусгах чадварыг тус тус тогтоосон (**4-р хүснэгт**).

4-р хүснэгт. Индол цууны хүчил нийлэгжүүлэх, фосфат, цайр уусгах чадвартай эндофит бактери

| № | Ургамлын нэр | Өсгөврийн дугаар | | |
|---|------------------------|--|----------------|----------------|
| | | ИЦХ | Фосфат | Цайр |
| 1 | Урал чихэр өвс | P23-R1, P23-R2, P23-R3, P23-R4, P23-R5, P23-R8 | P23-R2, P23-S2 | - |
| 2 | Зүүнгарын гоёо | P26-H1, P26-H3, P26-H4 | P26-H1, P26-R1 | P26-ZO1 |
| 3 | Пржевальскийн зээргэнэ | P27-S2 | P27-L3 | - |
| 4 | Төвд ланцай | - | P31-F1, P31-L1 | P31-F1, P31-L1 |
| 5 | Ягаан цээнэ | - | P32-R2 | - |

Тайлбар: (-) ИЦХ нийлэгжээгүй, фосфат болон цайр уусгаагүй

10 өсгөвөр ИЦХ нийлэгжүүлж, 8 өсгөвөр фосфат, 3 өсгөвөр цайрыг уусгах идэвхитэй байна. Урал чихэр өвснөөс ялгасан 6, Зүүнгарын гоёоноос ялгасан 3, Пржевальскийн зээргэнээс ялгасан 1 өсгөвөр ИЦХ нийлэгжүүлж байв. Урал чихэр өвсний үндэснээс ялгасан P23-R2, Зүүн гарын гоёоны газрын дээд хэсгээс ялган авсан P26-H1 дугаартай өсгөврүүд нь ИЦХ нийлэгжүүлэхээс гадна фосфат уусгах чадвартай байна. Мөн Төвд ланцайны цэцэг болон навчнаас ялгасан P31-F1, P31-L1 өсгөврүүд нь фосфат болон цайрын аль алиныг уусгах чадвартай байна.

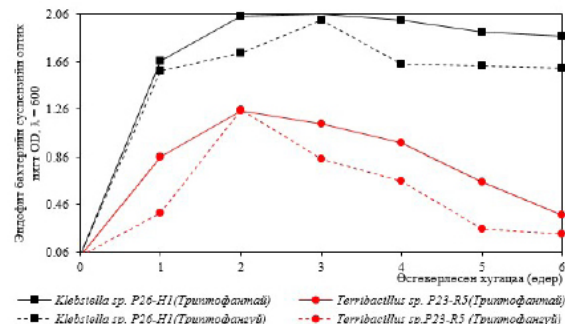
Индол цууны хүчил нийлэгжүүлэх чадвартай P26-H1, P23-R5 дугаартай өсгөврүүдийг цаашдын туршилтанд сонгон авав (**1-р зураг**). Эхлээд P26-H1, P23-R5 урьдчилан NB шингэн тэжээлийн орчинд 130 эрг/мин-аар сэгсэрч 24 цаг өсгөвөрлөв. Үүний дараа 1 мл өсгөврийг 100 мл триптофантай болон триптофангүй NB шингэн тэжээлийн орчинд



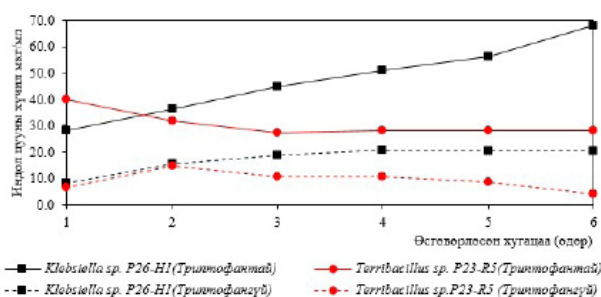
1-р зураг. Индол цууны хүчил үүсэлт - эерэг өсгөвөр (тод улаан өнгө)

Триптофантай орчинд *Klebsiella* sp. P26-H1 өсгөврийн өсөлтийн динамикийг хэмжихэд эхний 2 өдөр эрчимтэй өсөж, 3 дах өдрөөс өсөлт нь

тогтворжсон бол триптофангүй орчинд 1,5 хоног буюу 36 цагаас огцом өсөж 4 дэх өдрөөс тогтворжиж байна. *Terribacillus* sp. P23-R5 өсгөвөр триптофантай орчинд 2 дах өдөр буюу лог фазаас эсийн өсөлт тогтворжихгүйгээр шууд буурсан. Триптофангүй



2-р зураг. Триптофантай болон триптофангүй орчинд эндофит бактерийн өсгөврийн өсөлтийн динамик



3-р зураг. Триптофантай болон триптофангүй орчинд нийлэгжсэн ИЦХ

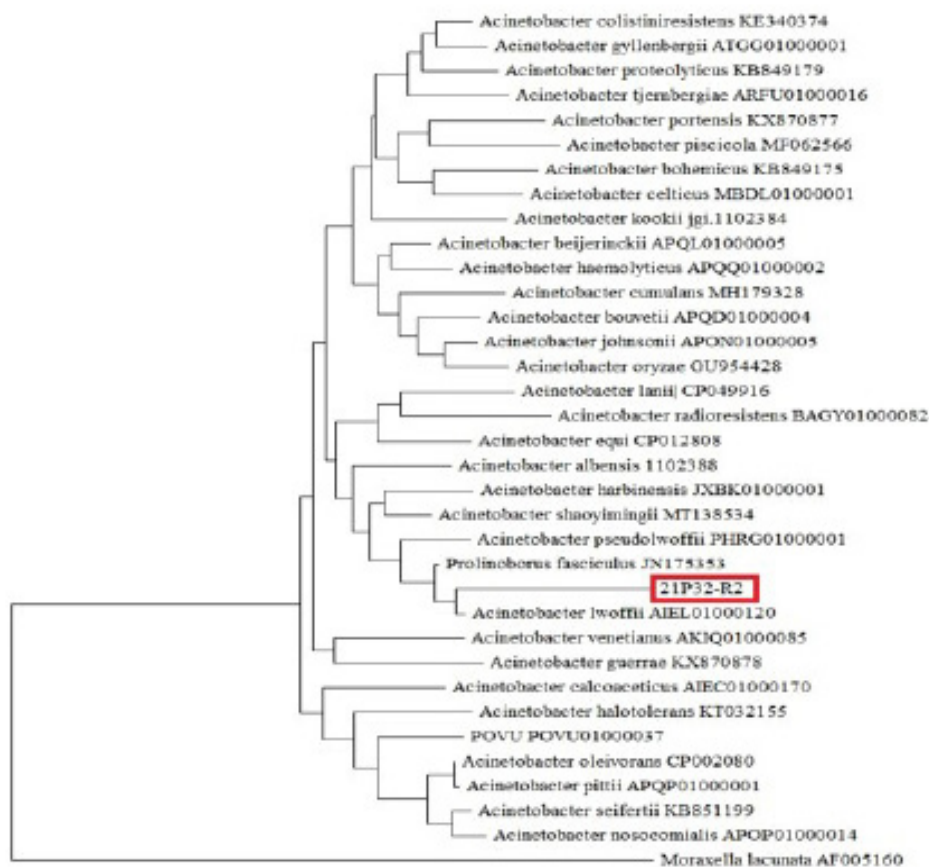
орчинд мөн адил 2 дах өдөр буюу лог фазаас эсийн өсөлт тогтворжихгүйгээр шууд буурч байна.

Триптофантай орчинд *Klebsiella* sp. P26-H1 өсгөврийн нийлэгжүүлж буй ИЦХ-ийн хэмжээ нь эхний өдөр 28.1 мкг/мл, 2 дахь өдөр 36.1 мкг/мл, 3 дахь өдөр 44.9 мкг/мл, 4 дэхь өдөр 50.9 мкг/мл, 5 дахь өдөр 56.2 мкг/мл, 6 дахь өдөр 68.2 мкг/мл болон тасралтгүйгээр нэмэгдэж байна. Харин *Terribacillus* sp. P23-R5 өсгөврийн ИЦХ-ийн нийлэгжилт нь эхний өдөр хамгийн өндөр 39.9 мкг/мл байсан ба 2 дах өдрөөс эхлэн буурч 31.95 мкг/мл болсон ба 3, 4, 5, 6 дах өдрүүдэд 27.9 мкг/мл болж тогтмолжин ИЦХ нийлэгжилт зогссон байна. Триптофангүй орчинд *Klebsiella* sp. P26-H1 өсгөвөр нь мөн л ИЦХ-ийг тогтмол нийлэгжүүлж байсан. 1 дэхь өдөр 8.1 мкг/мл, 2 дахь өдөр 15.6 мкг/мл, 3 дахь өдөр 18.8 мкг/мл, 4, 5, 6 дахь өдрүүдэд нийлэгжүүлэх индол цууны хэмжээ (20.2 мкг/мл) өөрчлөгдөөгүй.

Харин *Terribacillus* sp. P23-R5 өсгөврийн ИЦХ-ийн нийлэгжилт нь 1 дэхь өдөр 6.7 мкг/мл, 2 дахь өдөр 14.2 мкг/мл, 3 дахь өдөр 10.6 мкг/мл, 4 дэхь өдөр 10.8 мкг/мл, 5 дахь өдөр 8.7 мкг/мл, 6 дахь өдөр

5-р хүснэгт. Эндофит бактерийн ангилалзүйн хамаарал

| Дээж ургамал | Өсгөврийн дугаар | 16S рРНХ генийн нуклеотидын дарааллаар хамгийн ойр төрөл, зүйл | Төстэй хувь (%) |
|--|------------------|--|-----------------|
| Урал чихэр өвс <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. ex DC. | P23-R1 | <i>Paenibacillus terrae</i> | 99.0 |
| | P23-R3 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 100 |
| | P23-R4 | <i>Terribacillus saccharophilus</i> | 99.3 |
| | P23-R5 | <i>Terribacillus saccharophilus</i> | 100 |
| | P23-R6 | <i>Bacillus halotolerans</i> | 100 |
| | P23-R8 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> | 100 |
| | P23-S2 | <i>Bacillus halotolerans</i> | 100 |
| Зүүнгарын гоёо <i>Cynomorium songaricum</i> Rupr. | P26-H1 | <i>Klebsiella michiganensis</i> | 99.9 |
| | P26-H5 | <i>Alcaligenes faecalis</i> | 100 |
| | P26-R1 | <i>Serratia ficaria</i> | 99.8 |
| | P26-ZN2 | <i>Bacillus atrophaeus</i> | 100 |
| | P26-ZN4 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 100 |
| | P26-ZO1 | <i>Pseudomonas argentinensis</i> | 99.9 |
| Пржевальскийн зээргэнэ <i>Ephedra Przewalskii</i> Stapf. | P27-R1 | <i>Bacillus mojavensis</i> | 99.8 |
| | P27-L3 | <i>Peribacillus frigoritolerans</i> | 99.8 |
| | P27-S2 | <i>Bacillus mojavensis</i> | 99.9 |
| Төвд ланцай <i>Lancea tibetica</i> Hook.f. & Thomson | P31-F2 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 100 |
| Ягаан цээнэ <i>Paeonia anomala</i> L. | P32-R2 | <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 98.0 |
| Эгэл өмхий өвс <i>Peganum harmala</i> L. | P35-S2 | <i>Paenibacillus taichungensis</i> | 99.6 |



4-р зураг. Ягаан цээнэ (*Paeonia anomala* L.) -ээс ялган авсан P32-R2 өсгөврийг ойролцоо зүйлтэй харьцуулсан филогенетик мод

хамгийн бага буюу 4.3 мкг/мл болж буурсан.

Эндофит бактерийн өсгөврүүдээс ИЦХ нийлэгжүүлэх, фосфат, цайр уусгах чадвартайгаас гадна антагонист идэвхтэй, колонийн хэв шинж өөр нийт 23 өсгөвөр сонгон авч нуклеотидын дарааллыг тогтоов. Ингэхэд 19 өсгөврийн нуклеотидын дараалал уншигдаж ангилалзүйн хамаарлыг тодорхойлов (**5-р хүснэгт**). Нийт 6 ургамлаас ялган авсан 19 өсгөврийг 16S рРНХ генийн нуклеотидын дараалалд тулгуурлан тодорхойлоход 9 төрөлд хамаарагдаж байна. *Bacillus*-ийн төрөлд 6, *Pseudomonas*-ийн төрөлд 2, *Peribacillus*-ийн төрөлд 3, *Terribacillus*-ийн төрөлд 2, *Paenibacillus*-ийн төрөлд 2, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Serratia*-ийн төрөлд тус тус нэг өсгөвөр хамаарагдаж байна. Онцлон хэлэхэд Зүүнгарын гоёоны 6 өсгөвөр нь 6 өөр төрөлд хамаарагдаж байна.

Ягаан цээнээс ялгасан фосфат уусгах чадвартай P32-R2 дугаартай өсгөврийн 16S рРНХ генийн нуклеотидын дарааллаар хамгийн ойр зүйл нь *Acinetobacter lwoffii* (98%) байна. Филогенетик мод байгуулахад P32-R2 дугаартай өсгөвөр *Acinetobacter lwoffii* зүйлтэй нэг төрөлд гэхдээ бие даасан шинэ зүйл болохыг тогтоов (**4-р зураг**).

Хэлэлцүүлэг

Ургамлын өсөлтөд нэн шаардлагатай гормон болох ИЦХ нь триптофанаас хамааралтай, эсвэл хамааралгүйгээр ургамал болон бактерийн эсэд нийлэгжиж байдаг. Бидний ИЦХ-ийн нийлэгжлийг туршсан дүнгээс харахад триптофангүй орчинд өсгөвөрлөсөн өсгөврүүдийн ИЦХ хэмжээ нь триптофантайгаас 2-3 дахин бага байсан (зураг 3). Хэвлэлийн тоймоос харахад *Klebsiella* төрлийн өсгөврийг ИЦХ нийлэгжүүлэх чадвараар *Bacillus*, *Enterobacter* төрлийн өсгөврүүдээс илүү сайн хэмээн тэмдэглэсэн байна [10]. Бохирдсон хөрснөөс ялгасан ИЦХ нийлэгжүүлдэг 18 өсгөвөр дундаас *Klebsiella pneumoniae* AWD5 өсгөвөр глюкоза агуулсан тэжээлийн орчинд хамгийн их буюу 95.31 мкг/мл ИЦХ нийлэгжүүлж байсан байна [11]. Ургамлын өсөлтийг дэмждэг *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* гэх мэт олон төрлийн эндофит бактери тэмдэглэгдсэн байдаг [12]. Египетийн цөлд ургадаг *Fagonia mollis*, *Achillea fragrantissima* эмийн 2 ургамлаас эндофит бактерийн 13 өсгөвөр ялган авснаас 8 өсгөвөр *Bacillus*, 2 өсгөвөр *Paenibacillus*, 3 өсгөвөр *Brevibacillus* төрөлд хамаарагдаж байсныг тэмдэглэсэн байна [13].

Хятадын Шинжань аймгийн 3 өөр газраас цуглуулсан *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (licorice) ургамлаас нийт 116 өсгөвөр ялган авч ангилал зүйн хамаарлыг нь тогтооход 20 төрөл илэрсэн ба үүний 65% нь *Bacillus* төрлийн бактери эзэлж байсан байна [14]. *Bacillus subtilis* төрлийн бактерийг биохяналт болгон өргөнөөр ашигладаг. Судлаачид эрдэнэ шишийн өвчин үүсгэгч *Fusarium verticillioides* зүйлийн мөөгөнцрийг дарангуйлах шинж чанар бүхий *Bacillus mojavensis* бактерийг олж илрүүлэн, түүнийг биохяналт болгон ашигладаг *Bacillus subtilis* бүлгээс тусгаар, эндофит биохяналтын бүлэг болгон ангилсан байна [15]. Биохяналт болгон ашиглаж байгаа *Bacillus mojavensis*-тэй 99,1% ба 100% төстэй 2 өсгөврийг бид Пржевальскийн зээргэнээс олж илрүүлээд байна. Гадаадын судлаачид *Pennisetum glaucum* үр тарианы ургамлын үндэс болон ойр орчмын хөрснөөс 31 өсгөвөр ялгасан ба 24 нь *Acinetobacter calcoaceticus*, 1 өсгөвөр нь *Acinetobacter baumannii*, 6 өсгөвөр нь *Acinetobacter* sp. тус тус хамаарагдаж, эдгээрээс 26 өсгөвөр фосфат уусгах чадвартай байсан байна [16]. Тарималжуулсан эмийн ургамлаас ялгасан *Alcaligenes* төрлийн эндофит бактери ургамлын үндсэнд өвчин үүсгэдэг *S. rolfsii* мөөгөнцрийн эсрэг идэвхтэйгээс гадна ургамлын өсөлтийг дэмжих чадвартай [17]. Бидний судалгаагаар Зүүнгарын гоёоноос ялгасан *Alcaligenes* төрлийн (P26-H5) өсгөвөр нь *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger* зэрэг 3 тест организмын эсрэг идэвхтэй байв.

Дүгнэлт

Монгол орны нэн ховор болон ховор эмийн ургамлаас эндофит бактерийн 41 өсгөвөр ялган авч, 19 өсгөврийг генийн түвшинд тодорхойлон *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Peribacillus*, *Terribacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Serratia* гэсэн 9 өөр төрөлд хамаарагдаж буйг тогтоов. *Klebsiella*, *Alcaligenes* төрлийг Монголд шинээр тэмдэглэв. Мөн антагонист идэвхтэй 4 өсгөвөр, ургамлын өсөлтийн гормон болох ИЦХ нийлэгжүүлэгч 10, фосфат уусгах чадвартай 8, цайр уусгах чадвартай 3 өсгөврийг олж тогтоосон нь цаашид эдгээр өсгөврүүдийг хөдөө аж ахуй газар тариаланд ашиглах бэлдмэл үйлдвэрлэх технологийн судалгааны суурь болох ач холбогдолтой.

Талархал

Энэхүү судалгааг Шинжлэх ухаан технологийн сангийн санхүүжилттэй ШуУз_2020/01 төслийн хүрээнд гүйцэтгэв.

Ашигласан бүтээл

- [1] I. Afzal, Z.K. Shinwari, S. Sikandar, S. Shahzad, Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research.*, 21 pp. 36-49. Apr. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- [2] A. Dahiya, R. Kumar, and S. S. Sindhu, Microbial Endophytes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. *Endophytes: Mineral nutrient management.*, vol. 3, pp. 3–10. May 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_3
- [3] D.K. Maheshwari. S. Dheeman, Endophytes in Mineral Nutrient Management: Introduction. *Endophytes: Mineral nutrient management.*, vol. 3, pp. 35–75. May 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_1
- [4] J. Enkh-Amgalan, M. Amarbayasgalan, T. Adiyadolgor, Endophytic fungi of Mongolian plants: a promising source for bioprospecting. *Proceedings of the conference: Prosperity of biotechnology and utilization of genetic resources*, 2018.06.08. Ulaanbaatar, pp. 97-104, 2018
- [5] J. Enkh-Amgalan, Isolation and antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Mongolia. *Proceedings of Institute of Biology, MAS.*, vol. 29, pp. 35-37, 2013
- [6] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*, vol. 6, pp. 71-79, Apr. 2016, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- [7] SB. Rajini, M. Nandhini, AC. Udayashankar, SR. Niranjana, OS. Lund, HS. Prakash, Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathol.*, vol. 69, pp. 642–654, Jan. 2020, <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>
- [8] P. Vyas, P. Rahi, A. Chauhan, A. Gulati, Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Mycological Research.*, vol. 111, pp. 931-938, Aug. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.003>
- [9] C.M. Senthil Kumar, T.K. Jacob, S. Devasahayam, S. Thomas, C. Geethu, Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Microbiological Research.*, vol. 207, pp. 153–160, March. 2018, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.017>
- [10] M.A. Mowafy, M.M. Fawzy, A. Gebreil, and A. Elsayed, Endophytic *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* enhance the growth and yield of maize. *Soil and plant science.*, vol. 71, pp. 237-246, Feb. 2021, <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1880621>
- [11] J. Rajkumari, L.P. Singha, P.Pandey, Genomic insights of aromatic hydrocarbon degrading *Klebsiella pneumonia* AWD5 with plant growth promoting attributes: a paradigm of soil isolated with elements of biodegradation. *3 Biotech*, Vol. 8, Feb. 2018, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1134-1>
- [12] U.K. Vandana, J. Rajkumari, L.P. Singha, L. Satish, H. Alavilli, P.D.V.N. Sudheer, S. Chauhan, R. Ratnala, V. Satturu, P.B. Mazumder, The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology.*, vol. 10, pp. 101, Feb. 2021, <https://doi.org/10.3390/biology10020101>
- [13] M.D.F. ALKhahtani, *et al.*, Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria from Desert Plants and Their Application as Bioinoculants for Sustainable Agriculture, *Agronomy.*, vol. 10, pp. 1325, Sep. 2020, <https://doi.org/10.3390/agronomy10091325>
- [14] L. Li, O.A. A. Mohamad, J. Ma, A.D. Friel, Y. Su, Y. Wang, Z. Musa, Y. Liu, P. Brian Hedlund, L.Wenjun, Synergistic plant–microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F, *Antonie van Leeuwenhoek.*, vol. 111, pp. 1735-1748. Oct. 2018, <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1062-4>
- [15] W.C. Bacon, M.D. Hinton, R.T. Mitchell, E.M. Snook, B. Olubajo, Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control.*, vol. 62, pp. 1-9, Jul. 2012, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.03.006>
- [16] F. Rokhbakhsh-Zamin D. Sachdev N. Kazemi-Pour, A. Engineer, KR. Pardesi, S. Zinjarde, PK. Dhakephalkar, BA. Chopade, Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum.*, *Journal of Microbiology and Biotechnology.* vol. 21(6), pp. 556-66, Jun. 2011, <https://doi.org/10.4014/jmb.1012.12006>
- [17] S. Ray, S. Singh, B.K. Sarma, H.B. Singh, Endophytic *Alcaligenes* isolated from horticultural and medicinal crops promotes growth in Okra (*Abelmoschus esculentus*), *Journal of Plant Growth Regulation.* vol. 35, pp. 401-412, June. 2016, <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9548-z>