

СТРЕПТОМІЦЕТИ РИЗОСФЕРНОЇ ЗОНИ ОСОКИ ШОРСТКОВОЛОСИСТОЇ (*CAREX HIRTA* L.) ТА ЇХ АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРИ НАФТОВОМУ ЗАБРУДНЕННІ ҐРУНТУ

Л. Буньо*, О. Громико, О. Цвілинюк, О. Терек, В. Федоренко

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bioza@ukr.net

В умовах польового модельного дослідження протягом трирічного періоду досліджено вплив сирової нафти на вміст стрептоміцетів у ризосфері й едафосфері рослин-фітомеліорантів *Carex hirta* L., які росли на дерново-підзолистому ґрунті м. Борислава. Зі збільшенням терміну деструкції нафти, на тлі падіння загальної кількості колонієутворювальних одиниць мікроорганізмів у ризосфері рослин *C. hirta* L. зростала кількість стрептоміцетів. На всіх етапах дослідження кількість стрептоміцетів у едафосфері рослин менша, ніж у ризосфері. Виділено 56 штамів стрептоміцетів із ризосферної зони *C. hirta* L. Досліджено їх антагоністичні властивості проти штамів бактерій *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Erwinia amylovora* MI2, *Pseudomonas piri* MI9, *Pseudomonas syringae* MI1, а також грибів *Candida famata* VKM Y9 і *Aspergillus awamori* NF142. Найбільше стрептоміцетів (до 50%), виділених як з фонового, так і з нафтозабрудненого ґрунту, пригнічували ріст грам-позитивних бактерій *B. subtilis* ATCC 31324 і *M. luteus* ATCC 4698. Великий відсоток (від 33,4 до 66,7%) штамів актиноміцетів були антагоністами фітопатогенних грам-негативних бактерій *P. piri* MI9, *P. syringae* MI1 та *E. amylovora* MI2. Найменшою (до 19–25%) була частка штамів, які пригнічували ріст грибів *C. famata* VKM Y9 і *A. awamori* NF142. Виявлено низку штамів стрептоміцетів з підвищеною чутливістю до макролідів та лінкоміцину, а також до β-лактамних антибіотиків.

Ключові слова: нафтозабруднений ґрунт, *Carex hirta* L., стрептоміцети, фітопатогенні бактерії, гриби, антагоністичні властивості, стійкість до антибіотиків.

Нафта – це складний комплекс речовин, до якого входять майже 3000 інгредієнтів, багато з яких надзвичайно токсичні для живих організмів [12]. Однак у малих концентраціях вона може бути джерелом живлення для мікроорганізмів [11]. Нафтове забруднення призводить до випадання найбільш чутливих ланок мікробного угруповання ґрунту [17] і збільшення чисельності нафтоокислювальних мікроорганізмів [7]. На початкових етапах нафтового забруднення у ґрунті активно розвиваються бактерії та гриби, багато з яких мають фітопатогенні властивості й негативно впливають на розвиток рослин у забрудненому ґрунті [20]. У такому ґрунті знижується пул мікробних антибіотиків, що збільшує терміни самоочищення ґрунту. Одними з основних продуцентів антибіотиків і ферментів серед ґрунтових бактерій є актиноміцети, що визначає їхні антагоністичні властивості [35]. Крім того, ці бактерії здатні формувати мутуалістичні зв'язки з рослинами, сприяючи їхньому росту і розвитку [32]. Нафтове забруднення ґрунту призводить до зниження чисельності актиноміцетів [14] і збіднення їхнього видового різноманіття [8]. Вони починають розвиватися після випаровування летких форм нафти [19] і відіграють ключову роль у подальших етапах деструкції нафти [26].

Близько 85% ґрунтів м. Борислава сильно забруднені нафтою і нафтопродуктами, оскільки на його території вже кілька століть ведеться нафтовидобуток [18]. За дії нафти ґрунт змінює свої властивості [28]. Наслідки цих змін залежать від типу ґрунту і складу нафти [10]. Прийнятним методом очищення і відновлення властивостей таких ґрунтів є фіторекультивация. Завдяки росту рослин збільшується кількість і активність ризосферних мікроорганізмів [31], що прискорює процеси деградації нафти у ґрунтах [21]. Осока шорстковолосиста (*Carex hirta* L.) – піонерний вид на нафтозабруднених ґрунтах міста Борислава [16]. Результати наших попередніх досліджень показали, що ріст цих рослин на таких ґрунтах пришвидшує процеси деградації нафти [4], у тому числі завдяки збільшенню активності мікроорганізмів у ризосферній зоні [4, 5]. Водночас, серед цих мікроорганізмів ми виявили фітопатогенні гриби [3], які можуть зменшувати стійкість рослин до нафтового забруднення.

Актиноміцети, головно представники роду *Streptomyces*, є постійним компонентом ґрунтів. Завдяки потужному ферментному комплексу вони відіграють важливу роль у відновленні ґрунтів, забруднених ксенобіотиками. На сьогодні немає даних про склад і властивості стрептоміцетного угруповання ризосферної зони *C. hirta* L. Тому метою нашої роботи було виділення актиноміцетів роду *Streptomyces* із ризосфери *C. hirta* L. і вивчення їхніх антагоністичних властивостей.

Матеріали та методи

Польовий дрібноділянковий дослід проводили на дерново-підзолистому ґрунті на території м. Борислава. Створено ділянки площею 4 м² у 3-кратній повторності. На кожну ділянку висаджували по 96 рослин. Контролем слугували ділянки ґрунту без внесення нафти (фоновий ґрунт). Ділянка, штучно забруднена нафтою (50 г нафти на 1 кг ґрунту), слугувала модельним ґрунтом.

Для створення ділянки була викопана траншея завглибшки 0,25 м і розміром 1 × 4 м. Дно траншеї покривали поліетиленовою плівкою з перфорацією. У кожну траншею вносили по 1000 кг ґрунту вологістю 15%. У модельний ґрунт вносили 50 кг нафти і перемішували. Через 20 днів після внесення нафти (необхідний термін для вивітрювання летких токсичних нафтопродуктів) у ґрунт висаджували вегетативні особини *C. hirta* L. Рослини були однаковими за віком і розмірами. Вологість ґрунту підтримували в межах 60% від повної вологоємності.

Відбір зразків ґрунту проводили на 30, 395 і 760 добу росту рослин *C. hirta* L., що відповідає 50, 415 і 780 добам деструкції нафти. На 30 добу росту рослини перебували у фазі розетки (7–9 листків), на 395 добу – у фазі цвітіння і на 780 добу – у фазі молочної стиглості.

Для виділення стрептоміцетів використовували ґрунт із ризосферної зони рослин *C. hirta* L. і міжрядь (едафосфери) на відстані 20 см від кореневої системи фонового та модельного ґрунтів. Проби ґрунту з дотриманням стерильності відбирали на глибині 5–8 см [13]. Наважки по 1,0 г коренів із ґрунтом, що не відділявся простим струшуванням, з кожного зразка поміщали в колбу з 100 мл стерильної водопровідної води й інтенсивно струшували протягом 15 хв. З отриманих суспензій готували десятикратні розведення. Поверхневий посів (розведення 10⁻²–10⁻⁵) здійснювали у трикратній повторності на вівсяне середовище (ВС) такого складу (г/л): мелене вівсяне зерно – 40, агар – 18, рН 7,5. Посіви інкубували в термостаті при температурі 28°C протягом 7 діб. Підраховували загальне число колонієутворювальних одиниць (КУО) у 1 г сухого ґрунту і проводили диференційований облік за морфологічними типами, мікроскопуючи колонії на чашках Петрі в оптичному мікроскопі. Для виділення чистих культур стрептоміцетів і подальшого культивування

використовували ВС. Ідентифікацію бактерій до роду проводили за визначниками Берджі [37] і Гаузе [6]. Відбирали колонії, які за своїми культурально-морфологічними ознаками відповідали роду *Streptomyces*. Створено колекцію з 56 штамів стрептоміцетів.

Вивчення антагоністичних властивостей штамів стрептоміцетів здійснювали таким способом. Штами висівали на ВС уколом. На 7 добу росту поверхню агару з колоніями досліджуваних штамів заливали 5 мл 0,7% L-агару [27], в який завчасно вносили тест-культури в титрі $(0,5-0,7) \times 10^8$ клітин/мл. Як тест-культури використовували бактерії *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Micrococcus luteus* ATCC 469, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F -51), *Erwinia amylovora* MI2, *Pseudomonas piri* MI9 і *Pseudomonas syringae* MI1, а також гриби *Candida famata* VKM Y9 і *Aspergillus awamori* NF142. Для вирощування бактерій використовували L-агар [27], а для грибів – середовище Беннета [27]. Бактерії культивували протягом 24 год при 37°C, дріжджі – 24–48 год при 28°C, а гриби – 48–72 год при 28°C. Після цього вимірювали діаметр зон затримки росту тест-культур. Кожен тест проводився у трикратній повторності. Рівень пригнічення розвитку тест-культур позначали як індекс активності (ІА) – відношення діаметра зони пригнічення росту тест-культури до діаметра колонії стрептоміцета.

Визначення спектра і рівнів стійкості виділених штамів до антибіотиків проводили методом дифузії антибіотиків в агар. Диски з антибіотиками накладали на поверхню ВС із попередньо засіяним газом досліджуваного штаму стрептоміцетів. Вимірювання діаметра зон пригнічення росту досліджуваних культур визначали на 3–6 добу інкубації. Використовували паперові диски з антибіотиками виробництва HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія). Кожен тест проводили у трикратній повторності.

Для кількісної характеристики стрептоміцетів у ризосфері рослин використовували показник R/S (rhizosphere/soil) – ризосферний ефект [2]. Визначали R/S за відношенням кількості стрептоміцетів у ризосфері до їхньої чисельності в едафосфері.

Результати і їхнє обговорення

При 5% забрудненні ґрунту нафтою на 50 добу її деградації і 30 добу росту рослин *C. hirta* L. на цьому ґрунті кількість КУО в їхній ризосферній зоні перевищувала контроль (кількість КУО в ризосфері рослин, які росли на фоновому ґрунті) у 6 разів. Через 415 діб деградації нафти значення цього показника перевищувало контроль лише в 2,5 разу. У кінці експерименту (на 780 добу) кількість КУО наблизилася до значень фонового ґрунту (табл. 1).

Якщо рослини *C. hirta* L. росли у присутності нафти, то в їхній едафосфері спостерігали незначне зростання чисельності КУО від початку і до кінця експерименту. Однак на всіх етапах дослідження кількість КУО в едафосфері рослин із модельного ґрунту була меншою (на 17–20%) від цього показника в контролі – едафосфері рослин із фонового ґрунту (табл. 1).

Порівнявши динаміку змін чисельності КУО в ризосфері й едафосфері рослин *C. hirta* L., які ростуть на нафтозабрудненому ґрунті, виявили тенденцію до зниження цього показника у ризосфері порівняно з едафосферою. На 30 добу росту рослин у ризосфері виявлено на 75% більше КУО, ніж у міжряддях, на 395 добу ці показники зрівнялися, а на 760 добу кількість КУО в ризосфері на 66% менша, ніж у міжряддях (табл. 1).

Зі збільшенням терміну деструкції нафти на тлі зменшення кількості КУО в ризосфері рослин, що ростуть на нафтозабрудненому ґрунті, у цьому мікробному угрупованні відбувається поступове збільшення частки стрептоміцетів (табл. 1). Через 395 діб їхня чисельність зросла майже в 4 рази, а ще через рік – у 8 разів щодо початкового показника

на 30 добу росту рослин. Ці значення перевищують контрольні (вміст стрептоміцетів у ризосфері рослин із фонового ґрунту) у 2 і 3 рази, відповідно. На всіх етапах дослідження кількість стрептоміцетів у едафосфері як на модельному, так і на фоновому ґрунті менша, ніж у ризосфері рослин. Наочним підтвердженням концентрації мікроорганізмів навколо коренів рослин є ризосферний ефект (R/S) [2]. R/S для стрептоміцетів у рослин *C. hirta* L., які росли за присутності нафти у ґрунті, був від 5 до 22, що перевищує показники контролю на 10–154% (табл. 1). Це свідчить про вищу активність стрептоміцетів у ризосфері рослин *C. hirta* за присутності нафти у ґрунті.

Одержані результати свідчать про те, що на початкових етапах експерименту в ризосфері рослин, які ростуть на нафтозабрудненому ґрунті, створюються кращі умови для мікроорганізмів, ніж в едафосфері. Коли токсичність нафти знижується і стресовий пресинг зменшується, мікроорганізми краще розвиваються в едафосфері, ніж у ризосфері.

На динаміку змін загального вмісту мікроорганізмів і, зокрема, стрептоміцетів у ризосфері й едафосфері рослин впливає комплекс чинників, а саме: кореневі виділення рослини, які містять речовини, одні з яких можуть стимулювати, а інші, навпаки, пригнічувати розвиток мікроорганізмів [1]; конкуренція між мікроорганізмами за джерела живлення в зоні корневих виділень [29]; здатність стрептоміцетів продукувати антибіотичні сполуки, літичні ферменти, які надають їм переваги перед іншими мікроорганізмами і можуть пригнічувати розвиток фітопатогенів [33]. Крім того, стрептоміцети можуть трансформувати нерозчинні форми фосфору, заліза, інших елементів, фіксувати азот, виділяти фітогормони й у такий спосіб сприяти росту і розвитку рослин [22]. За умов нафтового забруднення ґрунту відбуваються зміни морфогенезу, фізіологічних і біохімічних процесів, спрямовані на адаптацію як рослин, так і мікроорганізмів до цього стресу [26]. Це, у свою чергу, може впливати на згадану вище динаміку вмісту мікроорганізмів у ризосфері й едафосфері рослин. У наших попередніх дослідженнях з'ясовано [3, 5], що комплекс ґрунтових мікроміцетів після короточасного інгібування відповідає на нафтове забруднення збільшенням чисельності й посиленням активності, особливо меланінвмісних і фітопатогенних видів.

Згідно з даними літератури [19], розвиток стрептоміцетів у свіжозабрудненому ґрунті сповільнюється легкими фракціями нафти. На цьому етапі розвиваються нафтоокислюючі мікроорганізми, які успішно конкурують зі стрептоміцетами [7, 9, 17, 20]. Зростання частки стрептоміцетів у ризосфері *C. hirta* L. на більш пізніх етапах деструкції нафти може бути зумовлене наявністю в них потужного ферментного апарату, який дає їм змогу розкласти ті субстрати, що залишилися після перших етапів деструкції (як, наприклад, бітуми) і не можуть бути використані іншими групами мікроорганізмів [7]. Про зростання пулу ферментів стрептоміцетів у ризосферній зоні рослин при нафтовому забрудненні ґрунту свідчать й інші дані [25, 26]. Зміни чисельності стрептоміцетів у ризосфері можуть бути зумовлені не тільки зниженням вмісту нафти у ґрунті, але й фазами розвитку *C. hirta* L. [1, 9]. Фази розвитку рослин визначають кількість і склад корневих виділень, що позначається, насамперед, на чисельності й активності ризосферної мікрофлори. При нафтовому забрудненні морфогенез рослин *C. hirta* L. трохи пришвидшується, проте їхні фази розвитку не виходять за межі розвитку контрольних рослин.

Із ризосфери рослин *C. hirta* L., які росли на фоновому і забрудненому нафтою ґрунті, а також із міжрядь виділено 56 штамів стрептоміцетів і вивчено їхні антагоністичні властивості щодо восьми штамів бактерій і двох штамів грибів (табл. 2). Ці ізоляти виділено на 50 добу деструкції нафти. 23 штами походять з нафтозабрудненого, а 33 – з фонового

Таблиця 1
Чисельність мікроорганізмів у нафтозабрудненому і контрольному зразках
дерново-підзолистого ґрунту при вирощуванні рослини *S. hirta* L. ($K_{УО} = \times 10^6/\text{г ґрунту}$)

Відбір проб ґрунту	Ризосфера				Едафосфера (мікродія)				R/S*	
	К-сть КУО		К-сть КУО стрептоміцетів		К-сть КУО		К-сть КУО стрептоміцетів		Фоновий ґрунт (контроль)	Модельний ґрунт (5% нафти)
	Фоновий ґрунт (контроль)	Модельний ґрунт (5% нафти)	Фоновий ґрунт (контроль)	Модельний ґрунт (5% нафти)	Фоновий ґрунт (контроль)	Модельний ґрунт (5% нафти)	Фоновий ґрунт (контроль)	Модельний ґрунт (5% нафти)		
Фаза розетки (50 доба деструкції нафти)	31,9±0,11	186,5±3,19	1,7±0,03	1,4±0,07	135,2±1,27	106,4±2,18	0,41±0,02	0,31±0,01	4,1	4,5
Фаза цвітіння (415 доба деструкції нафти)	43,3±0,15	108,9±1,17	2,6±0,04	5,3±0,06	134,8±2,17	110,5±2,28	0,39±0,05	0,50±0,01	6,7	10,6
Фаза молочної стиглості (780 доба деструкції нафти)	36,8±0,19	38,2±0,14	3,7±0,14	11,2±0,06	136,7±1,19	113,3±1,14	0,43±0,08	0,51±0,02	8,6	21,9

Примітка. * – Ризосферний ефект для стрептоміцетів.

грунту. Ріст грамнегативних бактерій *E. coli* ATCC 25922 і *P. aeruginosa* ATCC 27853 пригнічували відповідно 13,9 і 5,6% штамів, виділених із фонового ґрунту. Однак вони мали мінімальні індекси активності (ІА) – від 1,1 до 3,0. Натомість серед штамів, виділених із забрудненого ґрунту, таких, які би пригнічували ріст *E. coli* ATCC 25922 і *P. aeruginosa* ATCC 27853, не виявлено. Великий відсоток (від 33,4 до 66,7%) штамів стрептоміцетів як з фонового, так і з нафтозабрудненого ґрунту виявляли антагоністичні властивості щодо фітопатогенних грамнегативних бактерій *P. piri* MI9, *P. syringae* MI1 і *E. amylovora* MI2. Переважна більшість із них мала мінімальні ІА. Проте серед них була певна частка штамів з високими ІА від 5,1 до 10, зокрема 11,1% щодо *P. piri* MI9.

Близько третини штамів стрептоміцетів із фонового і забрудненого ґрунту пригнічували розвиток *S. aureus* ATCC 25923 з ІА не більше, ніж 5. Найбільше стрептоміцетів, виділених як з фонового, так і з нафтозабрудненого ґрунту, пригнічували ріст *B. subtilis* ATCC 31324 і *M. luteus* ATCC 4698. Серед них виявлено штами з максимальними ІА (>10) щодо *M. luteus* ATCC 4698. Відсоток тих, що активні проти грам-позитивних бактерій, менший серед штамів, виділених із забрудненого ґрунту порівняно зі штамми з фонового ґрунту. Лише 25% штамів стрептоміцетів із фонового ґрунту пригнічували ріст дріжджів *C. famata* VKM Y9 з мінімальними ІА. Частка таких штамів зменшувалася більш ніж удвічі серед стрептоміцетів із забрудненого ґрунту. Подібна картина спостерігалася і при визначенні антагоністичних властивостей стрептоміцетів щодо гриба *A. awamori* NF142.

Таблиця 2

Розподіл штамів стрептоміцетів, виділених із фонового (I) та нафтозабрудненого (II) ґрунту, за рівнем антагоністичної активності, %

Тест-культура	Індекс активності							
	1,1-3		3,1-5		5,1-10		>10	
	I	II	I	II	I	II	I	II
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,9	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	5,6	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. piri</i> MI9	41,7	22,3	5,6	0	2,7	11,1	0	0
<i>P. syringae</i> MI1	44,4	33,3	13,9	33,4	0	0	0	0
<i>E. amylovora</i> MI2	44,6	55,6	2,7	11,1	2,7	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	27,8	22,3	8,3	11,0	0	0	0	0
<i>M. luteus</i> ATCC 4698	50,0	66,7	10,0	0	6,7	0	3,3	0
<i>B. subtilis</i> ATCC 31324	50,0	22,3	8,3	11,0	4,2	11,1	0	0
<i>C. famata</i> VKM Y9	25,0	11,1	0	0	0	0	0	0
<i>A. awamori</i> NF142	19,4	11,1	0	0	0	0	0	0

Дані, наведені в табл. 2, вказують на тенденцію до зменшення частки стрептоміцетів, що виявляють антагоністичні властивості щодо використаних тест-культур, серед тих, які виділені з нафтозабрудненого ґрунту, порівняно зі штамми з фонового ґрунту. Виняток становлять лише стрептоміцети, активні проти *P. syringae* MI1 і *E. amylovora* MI2. Відсоток штамів, активних проти цих фітопатогенів, залишався досить високим (66,7%) і серед стрептоміцетів, виділених із забрудненого ґрунту.

Одним із показників, який відображає реакції мікрофлори ґрунту на його забруднення, можуть бути зміни спектрів і рівнів стійкості як до хімічних сполук-забруднювачів, так і до інших антимікробних агентів, зокрема, антибіотиків. З огляду на це, стрептоміцети є особливо цікавим об'єктом, оскільки їм властива природна множинна стійкість до антибіотиків [15]. Ми порівняли спектри стійкості до антибіотиків у штамів стрептоміцетів, виділених з фонового і нафтозабрудненого ґрунту. Виявлено певні спільні риси спектрів антибіотико-резистентності більшості досліджених штамів – це стійкість до β-лактамних антибіотиків

бензилпеніциліну, оксациліну і ампіциліну, помірна чутливість до макролідів, лінкоміцину, хлорамфеніколу, рифампіцину і тетрацикліну, а також відносно висока чутливість до аміноглікозидів. Ці риси властиві і для багатьох раніше вивчених стрептоміцетів [15]. Однак ми виявили низку штамів стрептоміцетів зі спектрами стійкості до антибіотиків, які значно відрізнялися від типових. Двадцять штамів мали підвищену чутливість до макролідів і лінкоміцину, а дванадцять – до β -лактамних антибіотиків. У табл. 3 наведено приклади спектрів стійкості 12 таких штамів. Для порівняння у цій таблиці наведено спектр антибіотикорезистентності модельного об'єкта генетики стрептоміцетів *Streptomyces lividans* 66. Серед них штамми 21-2, 21-5, 24-7, 22-3, 26-9 мали підвищену чутливість до макролідних антибіотиків олеандоміцину, еритроміцину, а також лінкоміцину. Найбільш розповсюджена серед стрептоміцетів одночасна природна стійкість до макролідів, лінкозамідів і стрептограмінів типу В (так звана MLS-резистентність) визначається одним механізмом – метилуванням одного з залишків аденозину у 23S рРНК, яке контролюється *erm*-генами [36]. Відсутність природної MLS-резистентності (MLS^S-фенотип), свідченням чого є висока одночасна чутливість значної частини виділених нами стрептоміцетів до макролідів і лінкоміцину, може бути наслідком порушення цього механізму, зумовленого втратою *erm*-генів.

Сім з 12 наведених у табл. 3 штамів виявляли чутливість до β -лактамних антибіотиків. Із них два (21-6 і 22-1) чутливі до всіх трьох використаних β -лактамів: бензилпеніциліну, оксациліну й ампіциліну, два – до двох антибіотиків (26-1 і 26-9), а три (22-2, 22-7, 26-4) – тільки до ампіциліну. Природна стійкість стрептоміцетів до β -лактамних антибіотиків може бути зумовлена кількома причинами: конститутивним синтезом β -лактамаз, які можуть мати різну субстратну специфічність і визначати стійкість до різних β -лактамів [34], низькою афінністю до антибіотиків пеніцилін-зв'язувальних білків, які беруть участь у синтезі клітинної стінки стрептоміцетів [30], наявністю в їхній цитоплазматичній мембрані фенольних ліпідів [24]. Втрата природної резистентності стрептоміцетів до β -лактамних антибіотиків може бути спричинена мутаціями генів, що контролюють ці механізми, і може призводити до змін у будові та функціонуванні клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани цих бактерій.

Таблиця 3

Спектри стійкості до антибіотиків штамів, які виділені з дерново-підзолистого нафтозабрудненого ґрунту м. Борислава

№ штаму	Діаметр зон пригнічення росту, мм												
	olm	ery	lin	bpn	oxc	amp	kan	str	gen	cml	rif	tet	
<i>S. lividans</i>	10	12	7	0	0	0	38	25	24	12	6	10	
Ризосфера	21-2	32	22	22	0	0	0	28	23	22	26	0	0
	21-5	42	26	26	0	0	0	31	25	19	20	13	0
	21-6	25	15	15	13	8	15	28	26		18	8	0
	26-1	24	32	32	24	0	32	28	28	18	18	21	15
	26-4	34	29	29	0	0	17	7	25	16	24	0	0
	26-9	50	30	30	10	7	0	22	30	22	42	7	15
	26-10	28	24	24	0	0	0	35	30	21	16	14	0
Едафосфера	22-1	22	14	14	13	9	13	22	20	17	26	0	0
	22-2	16	14	14	0	0	24	14	20	13	26	24	15
	22-3	40	35	35	0	0	0	26	20	20	20	16	15
	22-7	14	18	18	0	0	12	18	13	14	25	0	13
	24-7	60	28	28	0	0	0	28	20	18	14	20	7

Примітка. olm – олеандоміцин, ery – еритроміцин, lin – лінкоміцин, bpn – бензилпеніцилін, oxc – оксацилін, amp – ампіцилін, kan – канаміцин, str – стрептоміцин, gen – гентаміцин, cml – хлорамфенікол, rif – рифампіцин, tet – тетрациклін.

У дослідженій колекції виявлено також штами, які виявляють підвищену чутливість одночасно до кількох різних антибіотиків. Наприклад, штам 21-2, крім MLS^S-фенотипу, виявляє вищу чутливість до хлорамфеніколу, а штам 26-9 має підвищену чутливість до MLS-антибіотиків, β-лактамів бензилпеніциліну й оксациліну, а також до хлорамфеніколу. Ці результати вказують на ймовірні множинні зміни ознак стійкості до антибіотиків у досліджених стрептоміцетів. Нестабільність множинної природної стійкості до антибіотиків, яка проявляється у втраті її генетичних детермінантів, зокрема делецій хромосомних генів, є однією з характерних рис стрептоміцетів [23]. Багато стресових факторів значно збільшують частоту цих втрат [15]. До них, очевидно, можна віднести і нафтове забруднення ґрунту – основного середовища існування стрептоміцетів. Ми не виявили закономірності у спектрах стійкості між ізолятами, виділених із фонового та модельного ґрунтів, або між ризосферними й едафосферними стрептоміцетами. Очевидно, що фоновий ґрунт, відібраний на території м. Борислава, вже має певний рівень забруднення, що може впливати на зміну спектра детермінантів стійкості в геномі стрептоміцетів.

Таким чином, виконані дослідження вказують на те, що кількісний і якісний склад стрептоміцетів нафтозабруднених ґрунтів у порівнянні з ґрунтом без нафти дає інформацію про ступінь порушення мікробної біоти в цілому та має прогностичну цінність для збереження ґрунтової супресивності за відношенням до патогенних і опортуністичних видів мікроорганізмів. Деякі з виділених штамів стрептоміцетів можуть бути основою у створенні біологічних препаратів для підвищення стійкості рослин при фіторекультивациі нафтозабруднених ґрунтів.

Висловлюємо щирю подяку Західно-Українському біомедичному дослідницькому центру (WUBMRC, 2010-2011, 14 конкурсу) за наданий грант для проведення досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев К. И. Почвенные актиномицеты и высшие растения. К.: Наукова думка, 1972. 63 с.
2. Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образов. журнал. 1998. № 10. С. 25–31.
3. Буньо Л., Худик О., Оліферчук В. та ін. Мікологічна характеристика кореневої зони рослин *Carex hirta* L. у нафтозабрудненому дерново-підзолистому ґрунті // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 64. С. 124–136.
4. Буньо Л. В., Цвілинюк О. М., Карпин О. Л. та ін. Ферментативна активність нафтозабрудненого ґрунту в кореневій зоні рослин *Carex hirta* L. // Ґрунтознавство. 2013. Т. 14. № 3–4. С. 43–51.
5. Буньо Л. В., Цвілинюк О. М., Терек О. І. Активність мікрофлори нафтозабрудненого ґрунту у ризосферній зоні рослин *Carex hirta* L. // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. № 3. С. 55–62.
6. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*. М.: Наука, 1983. 245 с.
7. Гирич И. Е., Карасев С. Г., Мельников Д. А. Поиск штаммов микроорганизмов – активных деструкторов нефтепродуктов // Современные проблемы биологических повреждений материалов (Биоповреждения – 2002): сб. статей V Междунар. науч.-практ. конф. (Пенза, 19–20 ноября 2002 г.). Пенза: ПГПУ им. В.Г. Белинского, 2002. С. 3–5.
8. Гузев В. С., Левин С. В. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв // Микроорганизмы и охрана почв. 1989. С. 129–150.

9. Захарченко А. В., Коржов Ю. В., Ланишина Е. Д. и др. Рекультивация нефтезагрязненной почвы по программе CLENSOIL // Почвоведение. 2011. № 4. С. 495–504.
10. Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. и др. Биодиагностика экологического состояния почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Ростов-на-Дону: Изд-во ЗЛО Ростиздат, 2007. 192 с.
11. Кржиж Л., Чепелахокова И., Мотейль П. и др. Опыт применения технологии очистки почвы, загрязненной нефтепродуктами, в условиях Крайнего Севера // Геоэкология, инженерная геология, геоэкология. 2007. № 6. С. 561–567.
12. Куликов О. В. Техногенные загрязнения нефтепродуктами почв и водных объектов // Бурение. 2002. № 12. С. 24–27.
13. Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 196 с.
14. Рыбак В. К., Овчарова Е. П., Коваль Э. З. Микрофлора почвы, загрязненной нефтью // Микробиол. журнал. 1984. Т. 46. № 4. С. 29–33.
15. Федоренко В. О. Генетичний контроль стійкості актиноміцетів до антибіотиків та його роль у біосинтезі антибіотиків: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.15. К., 2004. 32 с.
16. Цвілинюк О. М., Буньо Л. В., Карпин О. Л. та ін. Мікориза у *Carex hirta* L. як одна із умов виживання в нафтозабрудненому ґрунті // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 60. С. 320–326.
17. Широких И. Г., Ашихмина Т. Я., Широких А. А. Особенности актиномицетных комплексов в урбаногемах г. Кирова // Почвоведение. 2011. № 4. С. 199–205.
18. Шуміліна Х., Мельник А., Купер І. Звіт про науково-дослідну роботу. Технологічна схема дорозробки бориславського родовища з метою вилучення залишкових запасів нафти та зниження рівня загазованості. Борислав: НГВУ, 2004. 554 с.
19. Alexander M. Biodegradation and bioremediation. Academic Press Inc., San Diego. California, 1999. 453 p.
20. Ayotamunoa M. J., Kogbaraa R. B., Ogajib S. O. T., Probertb S. D. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural soil at port harcourt, Nigeria // Applid Energy. 2006. Vol. 83. N 11. P. 1249–1257.
21. Barua D., Buragohain J., Sarma S. K. Certain physico-chemical changes in the soil brought about by contamination of crude oil in two oil fields of Assam, NE India // Eur. J. Exp. Biol. 2011. Vol. 1. N 3. P. 154–161.
22. Bhattacharyya P. N., Jha D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28. P. 1327–1350
23. Cullum J., Altenbuchner J., Flett F., Piendl W. DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces* // Biotech. Genet. Engineerring Rev. 1986. Vol. 4. P. 59–78.
24. Funabashi M., Funa N., Horinouchi S. Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus* // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. N 20. P. 13983–13991.
25. Gurielidze M., Berishvili T., Cholokava N. et al. Oil Destructing extremophilic actinomycetes, isolated from various types of soil of Georgia // Bull. of the Georg. Natl. Acad. Sciences. 2009. Vol. 3. N 3. P. 118–121.
26. Kästner M., Breuer-Jammali M. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. Vol. 41. N 2. P. 267–273.
27. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. 634 p.

28. Kiss S. Advances in soil enzymology (Part I-II) // *Studia Univesitates Bades-Bolyai Biologia*. 2001. N 1. P. 3–48.
29. Lambers H., Mougel C., Jaillard B., Hinsinger P. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective // *Plant Soil*. 2009. Vol. 321. P. 83–115.
30. Ogawara H. Penicillin-binding proteins in *Actinobacteria* // *J. Antibiot.* 2014. Oct 29. doi: 10.1038/ja.2014.148. [Epub ahead of print].
31. Quiñones-Aquilar E. E., Ferra-Cerrato R., Gavi R. F. et al. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo // *Agrociencia*. 2003. Vol. 37. N 6. P. 585–594.
32. Ryan F. Seipke, Kaltenpoth M., Hutchings M. I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? // *FEMS Microbiol Rev.* 2012. Vol. 36. P. 862–876.
33. Seipke R., Kaltenpoth M., Hutchings M. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? // *FEMS Microbiol Rev.* 2012. Vol. 36. P. 862–876.
34. Sendouda A., Urabe H., Ogawara H. Cloning, nucleotide sequence and expression of a β -lactamase gene from *Streptomyces lavendulae* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1993. Vol. 112. P. 343–348.
35. Sharma M. Actinomycetes: source, identification, and their applications // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014. Vol. 2. N 3. P. 801–832.
36. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. Vol. 39. P. 577–585.
37. Whitman, W., Goodfellow M., Kämpfer P. et al. Bergey's Manual of systematic bacteriology // *Actinobacteria*. 2012. Vol. 5. 1750 p.

Стаття: надійшла до редакції 30.11.14

доопрацьована 18.05.15

прийнята до друку 19.05.15

ANTAGONISTIC PROPERTIES OF STREPTOMYCETES OF OIL-CONTAMINATED SOIL IN THE RHIZOSPHERE ZONE OF *CAREX HIRTA* L. PLANTS

L. Bunio, O. Gromyko, O. Tsvilynyuk, O. Terek, V. Fedorenko

Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bioza@ukr.net

Crude oil effect on development of streptomycetes in *Carex hirta* L. plants rhizosphere and edaphosphere was investigated in field experiment throughout three years. *C. hirta* L. plants were grown in sod-podzolic soil in Boryslav city. The quantity of cultivated colony-forming units in rhizosphere zone of *C. hirta* L. plants decreased every year. At the same time the quantity of cultivated streptomycetes in rhizosphere zone of *C. hirta* L. plants increased. The quantity of cultivated streptomycetes in rhizosphere zone was less than in edaphosphere at all stages of investigation. 56 strains of actinomycetes were isolated from the rhizosphere zone of *C. hirta* L. plants. Their antagonistic abilities against bacteria strains *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Erwinia amylovora* MI2, *Pseudomonas piri* MI9, *Pseudomonas syringae* MI1, yeast *Candida famata* VKM Y9, fungi *Aspergillus awamori* NF142 were investigated. The majority (up to 50%) of streptomycetes distinguished both with pure and from the polluted soil has antagonistic abilities against bacteria strains *B. subtilis* ATCC 31324 and

M. luteus ATCC 4698. The part of streptomycetes (from 33,4 to 66,7%) has antagonistic abilities against bacteria *P. piri* MI9, *P. syringae* MI1 та *E. amylovora* MI2. The least part of strains (up to 19–25%) has antagonistic abilities against yeast *C. famata* VKM Y9 and fungi *A. awamori* NF142. Some strains of streptomycetes has the increased sensitivity to macrolids, lincomicine and β -lactam antibiotics.

Keywords: crude oil contamination, streptomycetes, *Carex hirta* L., fitopatogenic bacteria, fungi, antagonistic properties, resistance against antibiotics.

АКТИНОМИЦЕТЫ РИЗОСФЕРЫ ОСОКИ ШЕРШАВОЙ (*CAREX HIRTA* L.) И ИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРИ НЕФТЯНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ ПОЧВЫ

Л. Буньо, А. Громыко, О. Цвилянук, О. Терек, В. Федоренко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: bioza@ukr.net

В условиях полевого модельного эксперимента в течение трехлетнего периода исследовали влияние сырой нефти на содержание стрептомицетов в ризосфере и эдафосфере растений-фитомелиорантов *Carex hirta* L., растущих на дерново-подзолистой почве г. Борислава. С увеличением срока деструкции нефти, на фоне падения общего числа колонийобразующих единиц микроорганизмов, в ризосфере растений *C. hirta* L. увеличивалось количество стрептомицетов. На всех этапах исследования количество стрептомицетов в эдафосфере растений меньше, чем в ризосфере. Выделены 56 штаммов стрептомицетов из ризосферной зоны *C. hirta* L. Исследованы их антагонистические свойства к штаммам бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *Erwinia amylovora* MI2, *Pseudomonas piri* MI9, *Pseudomonas syringae* MI1, а также грибов *Candida famata* VKM Y9 і *Aspergillus awamori* NF142. Больше всего стрептомицетов (до 50%), выделенных как из фоновой, так и из загрязненной нефтью почвы, угнетали рост грампозитивных бактерий *B. subtilis* ATCC 31324 и *M. luteus* ATCC 4698. Большая часть (от 33,4 до 66,7%) штаммов стрептомицетов были антагонистами фитопатогенных грамотрицательных бактерий *P. piri* MI9, *P. syringae* MI1 и *E. amylovora* MI2. Наименьшей (до 19–25%) была группа штаммов, угнетающих рост грибов *C. famata* VKM Y9 и *A. awamori* NF142. Обнаружены ряд штаммов стрептомицетов с повышенной чувствительностью к макролидам и линкомицину, а также к β -лактамам антибиотикам.

Ключевые слова: нефтезагрязненная почва, *Carex hirta* L., стрептомицеты, фитопатогенные бактерии, грибы, антагонистические свойства, устойчивость к бактериям.