

УДК 579.873:631.461

**АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АКТИНОМІЦЕТІВ ПРИКОРЕНЕВОЇ ЗОНИ
МАСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ *OLEA EUROPAEA* L.**

О. Громико

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: o_gromyko@franko.lviv.ua*

З прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L., яка росте в Нікітському ботанічному саду, виділено 129 штамів актиноміцетів. Досліджено їхні антагоністичні властивості проти грампозитивних бактерій *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Sarcina lutea* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, грамнегативних бактерій *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), фітопатогенних бактерій *Erwinia amylovora* Mi2, *P. syringae* Mi1, *P. piri* Mi9, *P. corrugata* 3'M, дріжджів *Candida famata* VKM Y9, а також грибів *Aspergillus awamori* NF142. Деякі штами актиноміцетів мали широкий спектр антибактерійних і фунгіцидних активностей, окремі ґрунтові ізоляти специфічно пригнічували ріст *P. syringae* Mi1 чи *Candida famata* VKM Y9. Доведена перспективність виділення та вивчення актиноміцетів із біотопів Кримського півострова, які мають здатність пригнічувати ріст фітопатогенних організмів і збудників захворювань людського організму.

Ключові слова: актиноміцети, фітопатогенні бактерії, антагоністичні властивості.

Актиноміцети є постійним компонентом ґрунтових і ризосферних угруповань [2, 6, 7, 9]. Поряд з іншими ризосферними мікроорганізмами вони відіграють важливу роль у розвитку рослин, беручи участь у забезпеченні їх елементами живлення, фітогормонами, вітамінами й іншими факторами росту [5, 12, 13, 16, 18, 20]. Актиноміцети є антагоністами щодо широко спектру патогенних мікроорганізмів [1]. Це зумовлено їхньою здатністю синтезувати вторинні метаболіти антибіотичної природи. Близько 70% відомих на сьогодні антибіотиків синтезують актиноміцети, серед яких 75% використовують у медицині та 60% у сільському господарстві [17, 23].

В останні два десятиліття активно досліджували комбінаторний біосинтез антибіотиків, створено цілий спектр напівсинтетичних сполук. Однак цей напрям не дав бажаного ефекту. Тому вчені повернулися до пошуку нових природних сполук із перевірених часом джерел – актиноміцетів [8, 21]. На сьогодні вже відкрито ряд нових антибіотиків, таких як манумбіцини А-Д [10], целастраміцини А-В [19], какадуміцини [11], деметилновобіоцини [14] та ін. Викладені факти вказують на велике прикладне значення пошуку нових природних антибіотиків у розробці ефективних медичних препаратів, а також у створенні сучасних біологічних методів захисту сільськогосподарських рослин і лісів від фітопатогенів. На цьому ґрунтується наш інтерес до виділення й аналізу актиноміцетів із різних екоотопів України. Доведено, що з просуванням на південь у комплексі ґрунтових мікроорганізмів зростає частка актиноміцетів і їхнє різноманіття [22, 15]. Тому ми зосередилися на вивченні актиноміцетних комплексів південного узбережжя Кримського півострова [4]. У цій роботі представлено дослідження антагоністичних властивостей актиноміцетів, виділених із прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L., яка росте в Нікітському ботанічному саду.

Матеріали та методи

Зразки ґрунту з коренями маслини європейської *Olea europaea* L. транспортували у стерильних пергаментних пакетах і зберігали при 4°C не більше 48 год.

Наважку коренів із ґрунтом, який не струшувався, поміщали в колбу зі 100 мл стерильної водопровідної води і струшували на качалці при 100 об/хв упродовж 15 хв. Корені виймали стерильним пінцетом, а з розчину робили 10-кратні розведення і висівали на чашки Петрі з вівсяним середовищем (BC) такого складу (г/л): мелене вівсяне зерно – 40, агар – 18, рН 7,5.

Первинну ідентифікацію актиноміцетів здійснювали за морфологічно-культуральними властивостями на середовищі Гаузе 1 [3]. В експериментах із дослідження антибіотичних властивостей виділених актиноміцетів використали такі тест-культури: *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Sarcina lutea* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), фітопатогенних бактерій *Erwinia amylovora* Mi2, *P. syringae* Mi1, *P. piri* Mi9, *P. corrugata* 3'M, *Candida famata* VKM Y9, *Aspergillus awamori* NF142. Бактерії вирощували на L-агарі [3], дріжджі – на середовищі Бенета [3], гриби – на середовищі Чапека [3].

Вивчення антимікробних властивостей ґрунтових ізолятів здійснювали таким чином: ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашку Петрі з BC, на 7-му добу росту заливали 0,7% L-агаром [3], який містив 10^9 клітин/мл тест-культур. Після інкубування тест-культур у термостаті при 28°C (бактерії – 24 год, дріжджі – 24–48 год і гриби – 48–72 год) вимірювали діаметр колоній, утворених актиноміцетами, та діаметр зон затримки росту тест-культур. За відношенням діаметра зон пригнічення до діаметра колоній визначали антибіотичну активність досліджуваних актиноміцетів, яку позначали як індекс активності (ІА).

Результати і їхнє обговорення

З прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. виділено 129 культур актиноміцетів. З метою оцінки антибіотичної активності виділених культур ми використали грампозитивні бактерії *B. subtilis* ATCC 31324, *S. lutea* ATCC 4698, *S. aureus* ATCC 25923 та грамнегативні бактерії *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51) (рис. 1).

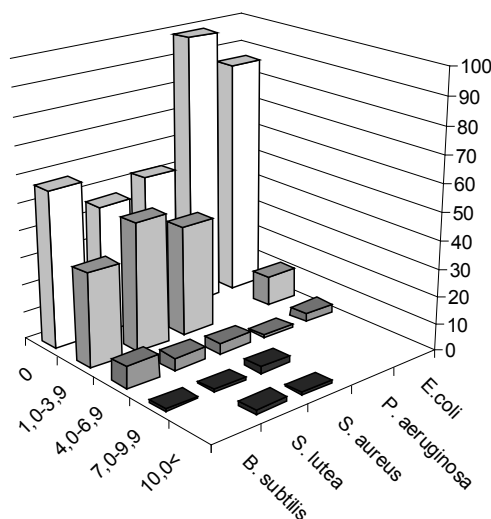


Рис. 1. Пригнічення розвитку бактерій актиноміцетами з прикореневої зони *Olea europaea* L. За віссю абсцис – ІА. За віссю ординат – кількість ізолятів, %.

Близько половини досліджених ізолятів тією чи іншою мірою пригнічували ріст *B. subtilis* ATCC 31324, *S. lutea* ATCC 4698. ІА більшості з них коливався в межах від 1,0 до 3,9. Окремі штами мали ІА 4,0-6,9 – 4,6% ізолятів, активних проти *S. lutea* і 8,0 – проти *B. subtilis*. Виділено також 0,8% штамів, активних проти цих тест-культур з ІА 7,0-9,9, а також 1,6% штамів з ІА більше 10,0 відносно *B. subtilis*. Подібний розподіл штамів за активністю спостерігали щодо *S. aureus* ATCC 25923. Проти *E. coli* ATCC 25922 активність виявляло 14% ізолятів, більшість із яких (10,9%) мали ІА 1,0-3,9 і лише 3,1% були активними на рівні ІА 4,0-6,9. У той же час серед виділених штамів актиноміцетів лише один ізолят виявляв активність проти *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51) з ІА 4,7.

Досліджуючи антагоністичні властивості виділених штамів актиноміцетів проти фітопатогенної мікрофлори, як тест-культури використали грамнегативні палички родів *Pseudomonas* і *Erwinia* (рис. 2). Чутливість трьох видів псевдомонад, які є збудниками різних захворювань рослин, була різною. Зокрема, близько половини штамів актиноміцетів пригнічували ріст *P. syringae* Mi1 – збудника бурого слизовиділення, обмороження, пошкодження плодів та плямистість листків плодкових і декоративних рослин, а також *P. piri* Mi9 – збудника бактерійного опіку груші. Антимікробна активність більшості з них коливалася в межах ІА 1,0-3,9. У той же час 4,7% ізолятів у відношенні *P. syringae* Mi1 мали ІА 4,0-6,9, а 2,3% штамів пригнічували ріст *P. piri* Mi9 на рівні ІА 7,0-9,9.

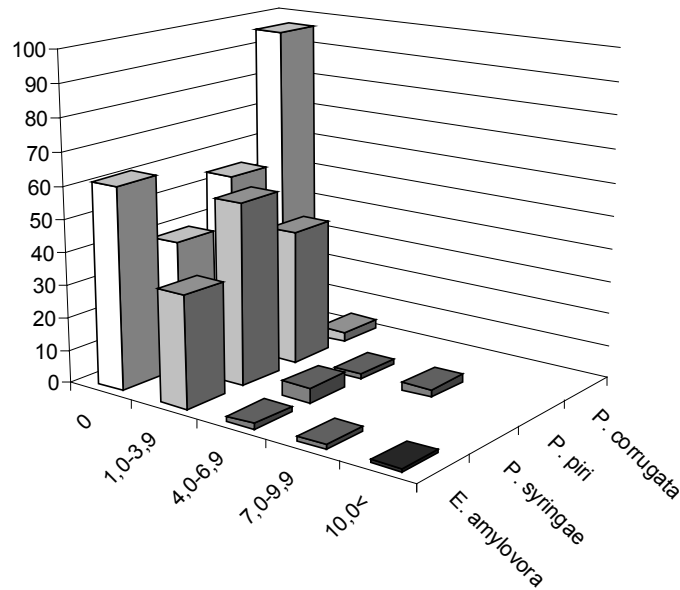


Рис. 2. Антагоністичні властивості штамів актиноміцетів із прикореневої зони *Olea europaea* L. щодо фітопатогенних бактерій. За віссю абсцис – ІА. За віссю ординат – кількість ізолятів, %.

Найстійкішим до дії актиноміцетних метаболітів серед досліджених фітопатогенних бактерій виявився збудник серцевинного некрозу стебел томатів *P. corrugata* З'М. Розвиток цих бактерій пригнічувало тільки 3,1% штамів актиноміцетів з ІА 1,0-3,9.

Фунгіцидна активність виділених штамів актиноміцетів була різною (рис. 3). Наприклад, ріст дріжджового гриба *C. famata* VKM Y9 пригнічувало трохи більше 40% актиноміцетів, а їхній ІА коливався від 1,0-3,9 у 40,3% до 4,0-6,9 у 2,4% штамів. Водночас активність проти плісеневого гриба *A. awamori* NF142 виявляло лише 0,8% штамів.

Досліджені культури актиноміцетів різнились як за рівнем антимікробної активності, так і за спектром тест-культур, ріст яких вони пригнічували (див. таблицю). Трохи більше 15% штамів не пригнічували розвиток жодної з використаних тест-культур.

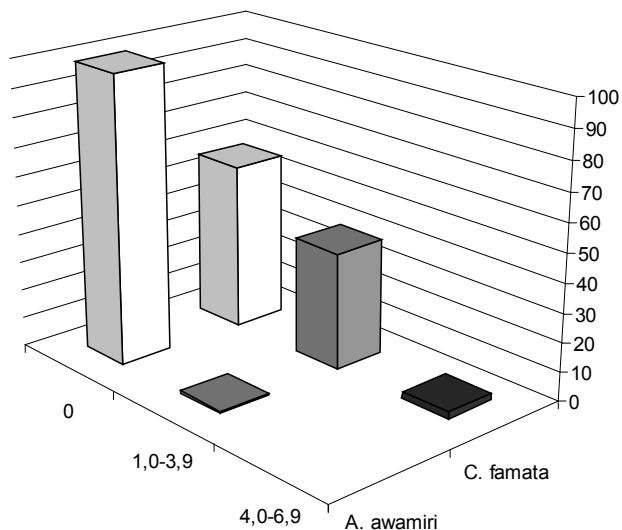


Рис. 3. Фунгіцидна активність штамів актиноміцетів із прикореневої зони *Olea europaea* L. За віссю абсцис – ІА. За віссю ординат – кількість ізолятів, %.

Деякі штами специфічно пригнічували ріст лише одного з використаних видів мікроорганізмів. Зокрема, штам 20-107 виявляв антагоністичні властивості тільки проти *P. piri* Mi9. Також ми виділили 3 ізоляти, які пригнічували ріст лише *P. syringae* Mi1, та один штам, активний проти *C. famata* VKM Y9. Деякі штами пригнічували ріст лише фітопатогенів, які спричинюють захворювання надземних частин рослин. Зокрема, штам 20-60 пригнічував розвиток *P. piri* Mi9 і *P. syringae* Mi1, а штам 20-66 – *P. syringae* Mi1 і *E. amylovora* Mi2. Інші ж штами, такі як 20-128, 20-144 і 20-204, пригнічували більшість із використаних тест-культур, причому мали одні з найвищих значень ІА.

Представлені результати вивчення антагоністичних властивостей актиноміцетів, які населяють ризосферу рослин південного узбережжя Кримського півострова, є продовженням наших досліджень, опублікованих у 2009 р. [4]. Як і в попередній роботі, ми виявили, що виділені ізоляти мали широкий спектр антагоністичних властивостей щодо грамположитивних і грампегативних бактерій, а також грибів.

Індекс активності окремих штамів актиноміцетів із прикореневої зони *Olea europaea* L.

Тест-культура	Номер штаму					
	20-107	20-60	20-66	20-128	20-144	20-204
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	6,7±0,6	4,7±0,3	5,0±0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	4,7±0,4	0	0
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	9,7±0,8	7,2±0,7	11,5±1,0
<i>S. lutea</i> ATCC 4698	0	0	0	10,2±0,9	6,6±0,5	9,8±0,9
<i>B. subtilis</i> ATCC 31324	0	0	0	7,0±0,7	4,7±0,4	6,4±0,6
<i>C. famata</i> VKM Y9	0	0	0	3,8±0,4	4,0±0,4	5,0±0,5
<i>A. awamori</i> NF142	0	0	0	0	0	0
<i>P. corrugata</i> 3' M	0	0	0	0	2,7±0,3	0
<i>P. piri</i> Mi9	3,0±0,3	1,1±0,1	0	9,1±0,8	9,0±0,8	9,8±0,9
<i>P. syringae</i> Mi1	0	1,3±0,1	1,2±0,1	6,3±0,6	4,0±0,4	3,8±0,3
<i>E. amylovora</i> Mi2	0	0	1,3±0,1	10,8±1,0	8,6±0,8	9,5±0,9

Однак серед штамів, описаних у цій роботі, ми не виділили жодного, який би пригнічував розвиток *A. awamori* NF142. При цьому близько 12% штамів актиноміцетів, виділених із ризосфери ялівця високого, пригнічували ріст цього гриба [4]. У той же час 3,1% актиноміцетів, виділених із прикореневої зони *Olea europaea* L., були антагоністами *P. corrugata* 3'М, а серед ізолятів, описаних у попередній роботі, жоден не пригнічував розвиток цього фітопатогена. Такі відмінності вказують на специфічність мікрофлори ризосфери різних видів рослин, зокрема біорізноманіття актиноміцетів. Отримані дані підтверджують необхідність подальших досліджень біорізноманіття актиноміцетів, які населяють різні екотопи південного берега Кримського півострова.

Автор висловлює щире подяку директору Ялтинського навчально-наукового центру біології і екології субтропічних рослин та ландшафтознавства, д-ру біол. наук., професору І. В. Митрофановій за допомогу у зборі зразків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурцева С. А., Сирбу Т. Ф., Сланина Т. Ф. Антагонистические свойства новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы // Микробиология і біотехнологія. 2007. № 1. С. 40–45.
2. Валагурова Е. В., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces* // К.: Наук. думка, 2003. 645 с.
3. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А. и др. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*. М: Наука, 1983. 245 с.
4. Громико О. М. Фунгіцидна й антибактерійна активність актиноміцетів, виділених із ризосфери ялівця високого *Juniperus excelsa* Vieb. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С.156–160.
5. Звягинцев Д. Г., Добровольская Т. Г., Лысак Л. В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // Журн. общ. биологии. 1993. Т. 54. № 2. С. 183–199.
6. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Экология актиномицетов. М.: Геос, 2001. 257 с.
7. Полянская Л. М., Звягинцев Д. Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // Почвоведение. 2005. № 6. С. 706–714.
8. Baltz R. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes // Current Opinion in Pharmacol. 2008. Vol. 8. P. 557–563.
9. Benizri E., Baudoin E., Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol Sci Technol. 2001. Vol. 11. P. 557–574.
10. Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* sp. NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans* // Microbiol. 2002. Vol. 148. P. 2675–2685.
11. Castillo U., Harper J. K., Strobel G. A. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia* // FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 234. P. 183–190.
12. Compant S., Duffy B., Nowak J. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 4951–4959.
13. Glick B. R., Todorovic B., Czarny J. et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // Crit. Rev. Plant. Sci. 2007. Vol. 26. P. 227–242.
14. Igarashi Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes // Actinomycetologica. 2004. Vol. 18. P. 63–66.

15. Janso J. E., Carter G. T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76. P. 4377–4386.
16. Kannan V., Sureendar R. Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion // *J. Basic Microbiol.* 2008. Vol. 49. P.158–164.
17. Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach // *Actinomycetologica.* 1993. Vol. 7. P.100–106.
18. Nimnoi P., Pongsilp N., Lumyong S. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production // *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 26 P. 193–203.
19. Pullen C., Schmitz P., Meurer K. et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae // *Planta.* 2002. Vol. 216. P. 162–167.
20. Sun Y., Cheng Z., Glick B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. Vol. 296 P. 131–136.
21. Qin S., Xing K., Jiang J.-H. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 89. P. 457–473.
22. Strobel G. A., Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. Vol. 67. P. 491–502.
23. Tanaka Y. T., Omura S. Agroactive compounds of microbial origin // *Annu. Rev. Microbiol.* 1993. Vol. 47. P. 57–87.

Стаття: надійшла до редакції 29.03.12

доопрацьована 13.04.12

прийнята до друку 18.04.12

ANTAGONISTIC PROPERTIES OF ACTINOMYCETES FROM THE RYZOSPHERE OF *OLEA EUROPAEA* L.

O. Gromyko

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: o_gromyko@franko.lviv.ua*

One hundred twenty nine actinomycetes strains were isolated from the rhizosphere of *Olea europaea* L. growing in the Nikita Botanical Gardens. Antimicrobial activities of the selected strains were tested against gram positive (*Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Sarcina lutea* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51)), phytopathogenes (*Erwinia amylovora* Mi2, *P. syringae* Mi1, *P. piri* Mi9, *P. corrugata* 3'M), yeast (*Candida famata* VKM Y9) and fungi (*Aspergillus awamori* NF142). Some of the selected isolates had broad spectrum of the antibacterial and fungicidal activities, several strains specifically inhibited growth of *P. syringae* Mi1 or *Candida famata* VKM Y9. Obtained results indicated that the habitats of Crimean peninsula are the attractive source for the isolation and investigation of different actinomycetes strains with antagonistic activity against bacterial plant and/or human pathogens.

Keywords: actinomycetes, phytopathogenes, antagonistic activity.

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИНОМИЦЕТОВ ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЫ МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ *OLEA EUROPAEA* L.

А. Громько

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: o_gromyko@franko.lviv.ua

Из прикорневой зоны маслины европейской *Olea europaea* L., произрастающей в Никитском ботаническом саду, выделено 129 штаммов актиномицетов. Исследованы их антагонистические свойства против грампозитивных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 31324, *Sarcina lutea* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora* Mi2, *P. syringae* Mi1, *P. piri* Mi9, *P. corrugata* 3^М, дрожжей *Candida famata* VKM Y9, а также грибов *Aspergillus awamori* NF142. Некоторые штаммы актиномицетов имели широкий спектр антибактериальных и фунгицидных активностей, отдельные почвенные изоляты специфически угнетали рост *P. syringae* Mi1 или *Candida famata* VKM Y9. Показана перспективность выделения и исследования актиномицетов в биотопах Крымского полуострова, которые способны угнетать развитие фитопатогенных организмов, а также возбудителей заболеваний человеческого организма.

Ключевые слова: актиномицеты, фитопатогенные бактерии, антагонистические свойства.