

РІСТ АКТИНОМІЦЕТІВ *IN VIVO* ТА *IN VITRO* НА ПОРОДАХ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ЗБАГАЧУВАЛЬНОЇ ФАБРИКИ “ЧЕРВОНОГРАДСЬКА”

Б. Осташ, Т. Грень, С. Бешлей, В. Баранов, В. Федоренко*

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

Досліджено ріст низки актиноміцетів на відвальних породах вугільного виробництва за умов прямої інокуляції у породу відвалу (*in vivo*) та глибинного культивування в середовищах, що містять породу (*in vitro*). Виявлено, що популяція *Streptomyces sioyaensis* практично зберігає свою чисельність після 22 місяців існування (з кінця червня 2009 по травень 2011 року) у породі відвалу в межах кореневої системи берези. Водночас титр *Streptomyces sioyaensis* знижувався на 3–4 порядки у породах без рослинного покриву. В експериментах *in vitro* *S. sioyaensis* та чотири актиноміцетних ізоляти з ризосфери берези *Betula pendula* продемонстрували різну ефективність росту, яка підвищувалася за умов сумісного культивування штамів.

Ключові слова: *Streptomyces sioyaensis*, актиноміцети, важкі метали, біоремедіація.

Бактерії, що належать до порядку *Actinomycetales* (актиноміцети), – одні з найтипівіших мешканців ґрунту. Вважають, що основна екологічна роль актиноміцетів у цьому середовищі – сапрофітна, вона полягає у гідролізі полімерів рослинного і тваринного походження (целюлоза, хітин, кератин, лігнін тощо) [5]. Сучасні дослідження свідчать про розповсюдженість актиноміцетів у всіх типах ґрунтів, включно з екосистемами антропогенного походження, де рівень забруднення важкими металами й іншими шкідливими речовинами сягає екстремальних значень. Наприклад, описано багато випадків виділення актинобактерій із місць видобування металів і вугілля, ділянок захоронення відходів гірничої промисловості [6–9]. Здатність актиноміцетів пристосовуватися до таких середовищ вказує на потенційні напрями їхнього практичного застосування у біоремедіації. Зокрема, створення і підтримання рослинного покриву на відвалах вугільної промисловості є типовим методом біоремедіації, що дає змогу стабілізувати відвал (зменшити його розмивання і вивітрювання) та сповільнити процеси кислотного дренажу [1, 2, 4].

Застосування методів біоремедіації становить значний інтерес в Україні, враховуючи розвиток видобувної промисловості та кількість відходів, яка при цьому генерується [2]. Світовий досвід показує, що універсальних методів їхньої біоремедіації не існує, оскільки історія формування, хімічна природа і кліматичні умови кожного відвалу особливі [7]. У центрі наших інтересів – відвал центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) “Червоноградська”, яка розташована в с. Сілець, неподалік смт Соснівка Сокальського р-ну. Породний відвал ЦЗФ займає площу 75 га, його висота – 68 м. Порода відвалу – кислотна і містить багато важких металів, деколи зі значним перевищенням ГДК. Зокрема, вміст свинцю, міді та цинку перевищує гранично допустиму концентрацію у 45, 81 і 30 разів відповідно [1].

Рослинність на відвалі практично відсутня, за винятком кількох сосен, беріз, верби козячої та ожини, а з трав’янистих – кількох скупчень куничника. Очевидно, це зумовлено відсутністю на відвалі органіки і надмірними кількостями важких металів. Численні дослідження свідчать, що ретельний підбір ризосферної мікрофлори може

підвищувати ефективність біоремедіації відвалу за рахунок сприяння ростові рослин – завдяки синтезові ауксинів, сидерофорів та інших біоактивних речовин [8, 9]. Дослідження мікробної компоненти породного відвалу ЦЗФ досі не виконувались. Першим кроком у цьому напрямі була спроба дослідити здатність низки актиноміцетів існувати у породах ЦЗФ.

Матеріали та методи

Для експериментів *in vivo* використано штам *S. sioyaensis* NRRL-B5408, який здатний окиснювати елемент сульфур і рости при слабкокислих значеннях рН [12]. Крім того, цей штам легко виявляти при виділенні з ґрунту, оскільки він формує характерний субстратний міцелій чорного кольору і продукує тіопептидний сіоміцин, який можна виявити за допомогою високочутливої репортерної системи [10, 11]. Для глибинної ферментації за наявності порід відвалу в експериментах *in vitro* використано 5 актиноміцетних ізолятів LV3, LV4, LV5, LV6. Ці ізоляти виділено співробітниками НДЛ-42 ЛНУ ім. І. Франка з ризосфери берези, що росте на відвалі ЦЗФ. За допомогою секвенування фрагментів генів 16S рРНК цих організмів перші 3 штами класифіковано як представників роду *Streptomyces*, LV6 – *Amycolatopsis*. Для визначення біологічної активності екстрактів використано тест-культури *Sarcina lutea* Lv65, *Bacillus subtilis* ATCC19637, *S. lividans* TK24 (рМО16) з колекції культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків ЛНУ ім. І. Франка.

Експерименти *in vivo*. *S. sioyaensis* NRRL-B5408 вирощували на агаризованому вівсяному середовищі протягом 8 діб при 30°C. Спори змивали дистильованою водою і відбирали за допомогою пробних піпеток. Суспензію центрифугували, супернатант зливали і осад ресуспендували у дистильованій воді. Кінцевий титр спор становив приблизно 10^8 к.у.о. У той самий день, 25 червня 2009 р., засівали спори NRRL-B5408 у породи відвалу. Для цього відбирали 1 дм³ породи (верхні 5 см) у зоні ризосфери берези і контрольних ділянок, де немає рослинного покриття, і ретельно змішували з 50 мл дистильованої води, що містив 3×10^6 к.у.о. *S. sioyaensis*. Для контролю якості змішування відбирали 3 см³ породи і перевіряли титр *S. sioyaensis* за допомогою висіву на чашки після повернення в лабораторію. В усіх випадках визначений титр становив приблизно 30–35% вихідного (3×10^3). Відхилення від очікуваного титру – типове, в літературі воно пояснюється тим, що частина актиноміцетних спор адсорбується на поверхні часточок ґрунту та інактивується в ньому. Через 22 місяці відбирали зразки породи і визначали титр *S. sioyaensis*. Продукцію сіоміцинів *in vivo* визначали за допомогою екстракції ґрунту хлороформом і подальшого аналізу екстракту з використанням *tipA*-залежної репортерної системи [10].

Експерименти *in vitro*. Штами *S. sioyaensis* та LV-ізоляти вирощували на вівсяному середовищі протягом 7 діб. Спорову суспензію штамів (приблизно 10^8 к.у.о.) вносили у 100-мл колби, що містили 15 мл середовища TSB. Після двох діб вирощування відбирали кількість середовища, яке містить приблизно 10^6 к.у.о. Культури промивали дистильованою водою і засівали в 300-мл колби, що містили 35 мл середовища MMST3 (г/л: MgSO₄ – 0,2, CaCl₂ – 0,02, KH₂PO₄ – 1, K₂HPO₄ – 1, FeCl₃ – 0,05, NaNO₃ – 1,5, сахароза – 1,9, порода з відвалу – 200,0, вода дистильована – до 1 л; рН до стерилізації – 7,2). Штами вирощували у MMST3 протягом 3 діб, після чого визначали рН, титр життєздатних клітин і антибіотичну активність супернатанту проти *Bacillus cereus* ATCC19637 і *Sarcina lutea* методом дифузії антибіотика в агар.

Результати і їхнє обговорення

Численні дослідження свідчать про високу варіабельність кількості життєздатних клітин і спор актиноміцетів у ґрунтах, яка також змінюється залежно від пори року. Про-

аналізувавши наявні дані [3], можна стверджувати, що один вид актиноміцета у бідних на органіку ґрунтах і в період найактивнішої життєдіяльності (літо) переважно виявляють у кількостях, що не перевищує 10^3 к.у.о. на 1 г субстрату. Тому ми взяли це значення як вихідне в експерименті з інтродукції відомого штаму-продуцента тіопептидного антибіотика сіоміцину *S. sioyaensis* у породу відвалу ЦЗФ. Штам інтродукували у дві ділянки без рослинного покриття, що знаходяться на відстані приблизно 300 м одна від одної, і в одну ділянку у межах ризосфери берези. Значення рН перших двох ділянок становило 5,1–5,3, у ризосферній зоні – 6,4. Через 22 місяці після інтродукції відібрано по три зразки породи з усіх ділянок, а також ділянок, що прилягають до берези, і визначено титр *S. sioyaensis*. Дані узагальнено на рис. 1. Помітно, що через 22 місяці культивування кількість к.у.о. у ризосфері залишається практично на рівні титру в день засіву, тоді як на ділянках без рослинного покриття (П1 і П2, рис. 1) титр знижується щонайменше на 2 порядки. Фактично, на цих ділянках тільки у двох із трьох повторів виявлено колонії *S. sioyaensis*. Отже, ризосфера рослин створює набагато сприятливіші умови для існування актиноміцета, тоді як екстремально оліготрофний характер ділянок П1 і П2, з різкими перепадами температури між сезонами, практично несумісний з існуванням *S. sioyaensis*. Ми також дослідили наявність *S. sioyaensis* у ділянках на відстані 15 і 50 см від зони інтродукції в ризосферу берези (сб1 і сб2, відповідно, на рис. 1). На ділянці, що розташована ближче до берези, в одному з повторів виявлено *S. sioyaensis*. Це може свідчити про поширення штаму у ґрунті, наприклад, за рахунок перенесення спор вітром або з потоками води після дощів.

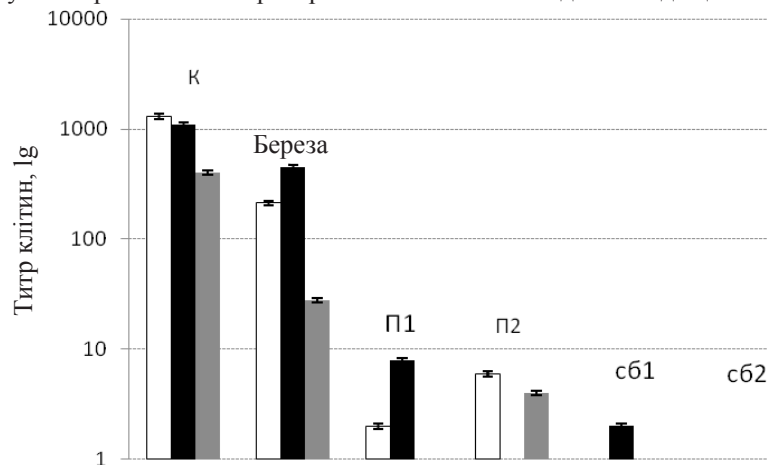


Рис. 1. Титр *S. sioyaensis* у зразках відвальних порід ЦЗФ одразу після засіву (К) і через 22 місяці інкубування (інші групи даних). Різними кольорами позначено три повтори для кожного зразка. Умовні позначення: береза – зразки з ризосфери берези; П1, П2 – зразки з породи без рослинного покриття; сб1 і сб2 – зразки з ділянок, суміжних з ділянкою інтродукції *S. sioyaensis* у ризосферу берези.

Високий титр *S. sioyaensis* у ризосфері берези вказує на те, що штам закріпився у цьому біотопі. Однак визначення титру не свідчить про метаболічну активність клітин, і можна припускати, що вихідна популяція спор не проростає і не розмножується та що титр життєздатних спор повільно зменшується. Тому ми вирішили дослідити накопичення у ґрунті сіоміцину – антибіотика, який продукує *S. sioyaensis* і який у цьому випадку слугує високоспецифічним маркером метаболічної активності штаму. Екстракт зі 100 г ґрунту ризосфери берези і контрольного зразка (сб2) нанесли на паперові диски та помістили на ага-

ризіване середовище з канаміцином, де попередньо засіяли культуру репортерного штаму *S. lividans* TK24 pMO16. Виявлено, що екстракт із ризосфери берези індукує ріст *S. lividans* TK24 pMO16 на середовищі з канаміцином, що недвозначно свідчить про наявність сіоміцину в досліджуваному зразку (рис. 2). Не виявлено сіоміцину у контрольному зразку. Оскільки спори *S. sioyaensis* не містять сіоміцину [3, 11], то наші результати вказують на те, що штам розвивається у ґрунті, формує міцелій, який і забезпечує продукцію антибіотика.

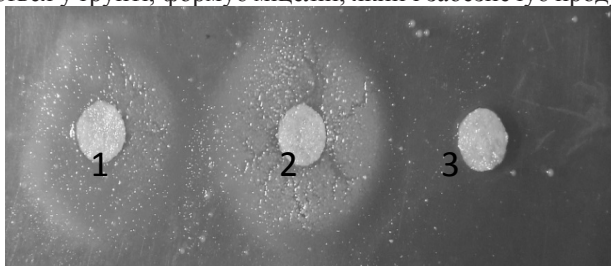


Рис. 2. Індуція росту канаміцинстійких клонів *S. lividans* TK24 pMO16 навколо дисків: 1 – з 60 нг сіоміцину; 2 – з екстрактом ґрунту ризосфери берези; 3 – екстракт породи ПІ (без рослинного покриву).

Ми також дослідили ріст *S. sioyaensis* і LV-ізолятів за умов глибинного вирощування у середовищі, що містить породу відвалу (20%, в/об) і без неї. За винятком ізоляту LV6, у всіх випадках наявність породи пригнічувала ріст актиноміцетів (рис. 3). Варто відзначити, що найсильніше пригнічення росту виявлено для ізоляту LV5, який відзначається найшвидшим ростом, а для LV6, що росте найповільніше, пригнічення не спостерігається. Ріст актиноміцетів за високих концентрацій шкідливих речовин може сприяти продукції певних вторинних метаболітів [8]. Ми визначили загальну антибіотичну активність 100 мкл культуральної рідини усіх штамів, вирощених за наявності породи і без неї. Для *S. sioyaensis* як тест-культуру використали *Sarcina lutea*, для LV-ізолятів – *Bacillus cereus*. В усіх випадках виявлено значну активність супернатантів проти використаних тест-культур (див. таблицю). У випадку ізоляту LV4 антибіотична активність у середовищі з відвальною зростала. Отже, досліджувані штами здатні продукувати вторинні метаболіти, які, імовірно, відіграють протекторну функцію у середовищах, що містять важкі метали й інші шкідливі речовини.

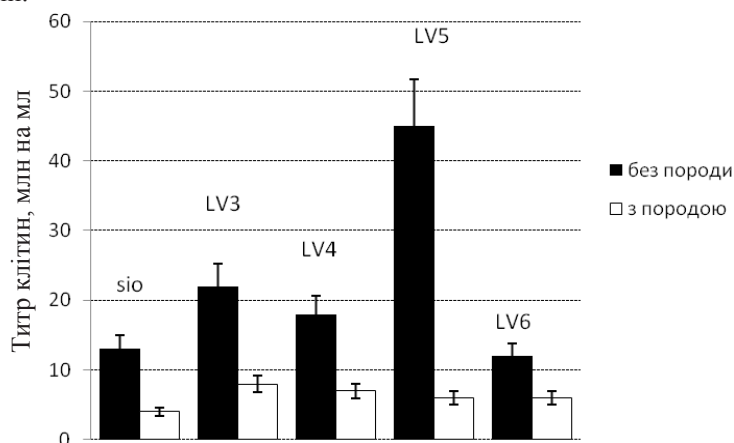


Рис. 3. Титр *S. sioyaensis* (sio) та ізолятів LV3-LV6, вирощених у контрольному середовищі (без породи, чорні стовпчики) і в середовищі, що містить 20% породи.

Загальна антибіотична активність супернатантів середовищ,
де вирощували штами актиноміцетів *S. siroyaensis* і LV3-6

| Середовище | Діаметри зон пригнічення росту тест-культур супернатантами штамів, мм | | | | |
|------------|---|------|------|-----|------|
| | <i>S. siroyaensis</i> | LV3 | LV4 | LV5 | LV6 |
| Без породи | 11±2 | 14±2 | 9±1 | 8±2 | 12±1 |
| З породою | 10±1 | 13±4 | 14±2 | 7±2 | 14±1 |

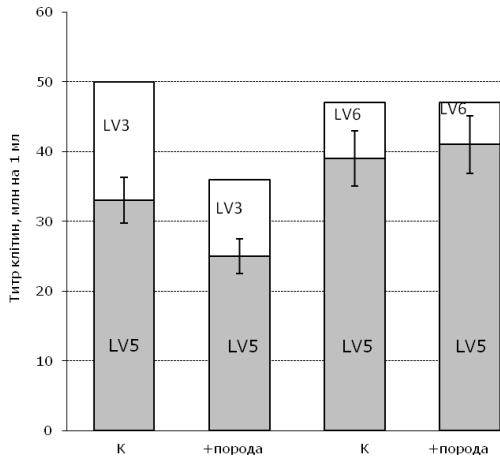


Рис. 4. Титр клітин ізоляту LV5 (сірі стовпчики) за умов кокультивування з LVIV3 або LV6. К – контрольне середовище (без додавання породи відвалу).

Ми також дослідили ріст кількох штамів за умов кокультивування. А саме, штам LV5, що характеризується найбільшим падінням виживання за наявності відвальної породи, вирощували разом з ізолятом LV3 і LV6, на які порода впливає незначно або не впливає взагалі (рис. 3). Виявлено, що, порівняно з контролем, кокультивування LV5 з двома іншими ізолятами сприяє кращому росту LV5 у середовищі з породою (рис. 4) порівняно з ростом у чистій культурі (див. рис. 3). Очевидно, що LV6 здатний продукувати певні метаболіти, які захищають його і LV5 від токсичної дії сполук, що містяться у породному відвалі. Ці дані, а також експерименти, описані вище, демонструють потенціал актиноміцетів як компонента різноманітних підходів до фітореMediaції техногенних середовищ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Баранов В. І., Книш І. Б. Хіміко-мінералогічний склад порід відвалу вугільних шахт ЦЗФ “Львівсистеменерго” та їх вплив на проростання насіння // Промислова ботаніка: стан та перспективи розвитку: Матеріали V міжнар. наук. конф. Донецьк, 2007. С. 36.
2. Баранов В., Рахметов Д., Гавриляк М. Вплив нових регуляторів росту на ростові та фізіологічні показники проростків тифону на витяжках із ґрунтів породного відвалу вугільних шахт // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 52. С. 192–198.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высш. школа, 1969.
4. Правила проведення біологічної рекультивації породних відвалів вугільних шахт України. Видання офіційне. К.: Мінвуглепром України, 2007. С. 30.
5. Chater K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006. Vol. 361. N 1469. P. 761–768.
6. Epelde L., Becerril J. M., Barrutia O. et al. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil // Environ. Pollut. 2010. Vol. 158. N 5. P. 1576–1583.
7. Haferburg G., Kothe E. Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 87. N 4. P. 1271–1280.
8. Ma Y., Prasad M.N., Rajkumar M., Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils // Biotechnol. Adv. 2011. Vol. 29. N 2. P. 248–258.

9. Margesin R., Plaza G.A., Kasenbacher S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites // *Chemosphere*. 2011. Vol. 82. N 1. P. 1583–1588.
10. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRLL-B5408 // *Folia Microbiol.* Vol. 54. P. 91–96.
11. Nishimura H., Okamoto S., Mayama M. et al. Siomycin, a new thiostrepton-like antibiotic // *J. Antibiot.* 1964. Ser.A14. P. 255–263.
12. Yagi S., Kitai S., Kimura T. Stimulative effect of elemental sulfur on siomycin production by *Streptomyces sioyaensis* // *Appl. Microbiol.* 1971. Vol. 22. P. 153–156.

Стаття: надійшла до редакції 30.06.11
доопрацьована 07.07.11
прийнята до друку 08.07.11

GROWTH OF ACTINOMYCETES *IN VIVO* AND *IN VITRO* ON THE COAL WASTE FROM CENTRAL ENRICHMENT “CHERVONOHRAДСKA”

B. Ostash, T. Gren, S. Beshley, V. Baranov, V. Fedorenko*

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

Growth of actinomycetes on coal waste was investigated under conditions of the direct inoculation (*in vivo*) and submerged cultivation in the media containing the waste (*in vitro*). The size of population of *Streptomyces sioyaensis* remained virtually unchanged after 22 months of field experiment (end of June 2009 – May 2011) in the rejected coal within the rhizosphere of birch. In the same time *Streptomyces sioyaensis* titer dropped 3–4 orders of magnitude in wast samples without plant cover. *In vitro*, *S. sioyaensis* and four actinomycete isolates from birch *Betula pendula* rhizopshere demonstrated different efficacy of growth, which increased significantly under co-cultivation conditions.

Key words: Streptomyces sioyaensis, actinomycetes, heavy metals, bioremediation.

РОСТ АКТИНОМИЦЕТОВ *IN VIVO* И *IN VITRO* НА ПОРОДАХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ОБОГАТИТЕЛЬНОЙ ФАБРИКИ “ЧЕРВОНОГРАДСКАЯ”

Б. Осташ, Т. Грень, С. Бешлей, В. Баранов, В. Федоренко*

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

Изучен рост ряда актиномицетов на отходах обогащения угля в условиях прямой инокуляции в порода отвала (*in vivo*) и глубоинной ферментации (*in vitro*). Обнаружено, что популяция *Streptomyces sioyaensis* практически сохраняет свою численность после 22 месяцев существования (конец июня 2009 – май 2011) в порода отвала в пределах корневой системы березы. В то же время, титр *Streptomyces sioyaensis* снижался на 3–4 порядка в породах без растительного покрова. В экспериментах *in vitro*, *S. sioyaensis* и четыре актиномицетных изолята из ризосферы березы *Betula pendula* демонстрировали различную эффективность роста, которая повышалась в условиях совместного культивирования штаммов.

Ключевые слова: Streptomyces sioyaensis, актиномицеты, тяжелые металлы, биоремедиация.