

**ГРОМИКО О.М.<sup>✉</sup>, ТІСТЕЧОК С.І., ЧОРНОБАЙ В.І., ФЕДОРЕНКО В.О.**

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua

<sup>✉</sup> o\_gromyko@franko.lviv.ua

## **АНТАГОНІСТИЧНІ ТА РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ АКТИНОМІЦЕТІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РИЗОСФЕРИ *THYMUS ROEGNERI* К. КОСН AGGR.**

Фітопатогенні мікроорганізми є однією з найголовніших загроз для агроєкосистем, лісо-паркових насаджень та міських зелених зон. Використання синтетичних пестицидів вважається дешевим та ефективним методом боротьби з фітопатогенами. Однак такий підхід суттєво погіршує екологічний стан довкілля і, як наслідок, є надзвичайно небезпечним для здоров'я людини [1]. Хімічні пестициди зазвичай не мають вибіркової дії, тим самим знищуючи разом із фітопатогенами корисну мікрофлору ґрунтів та філосфери рослин [2]. Крім того, фітопатогени досить швидко формують стійкість до препаратів, які тривалий час використовують у практиці, знижуючи їхню ефективність. З огляду на це актуальною є заміна існуючих підходів у боротьбі з інфекціями рослин на ефективніші, системні та екологічно чисті. Однією з альтернативних стратегій до вирішення цієї проблеми є розроблення біологічних методів боротьби для захисту рослин. Головним засобом у цьому є природні мікроорганізми – антагоністи фітопатогенів, серед яких чільне місце займають актиноміцети.

Актиноміцети є одним з основних компонентів ґрунтових мікробних популяцій та відіграють важливу екологічну роль в колообігу поживних речовин у ґрунті [3]. Ці мікроорганізми відомі своїм економічним значенням як продуценти широкого спектра біологічно активних молекул [4]. Актиноміцети є безмежним резервуаром генів біосинтезу антибіотиків та стійкості до них, що обґрунтовує зацікавленість ними як агентами біологічного контролю в якості заміни агрохімікатів. Поряд із цим, актиноміцети розглядають у якості бактерій, здатних стимулювати ріст рослин [5]. Колонізуючи кореневу систему рослин, ці бактерії вступають із ними в тісні симбіотичні зв'язки, сприяючи їхньому росту і розвитку [6]. Перелічені властивості можна оцінити в лабораторних умовах, що дозволяє здійснювати відбір штамів, перспективних для розробки біопрепаратів.

Ризосфера лікарських рослин може бути унікальним джерелом актиноміцетів із широким спектром антимікробних і рістстимулювальних властивостей [7]. Ефіроолійні рослини родини *Lamiaceae* мають широке застосування в харчовій, парфюмерно-косметичній та фармацевтичній промисловості [8]. До цієї родини належить рід *Thymus* L. (тим'ян). Усі види тим'яну синтезують ефірну олію, яка має високі антимікробні властивості. Такий ефект зумовлений присутністю в ефірній олії тим'яну терпенових сполук, особливо тимолу і карвакролу [9, 10]. *Thymus roegneri* К. Koch. aggr. є типовим представником флори Кримського півострова. В ефірній олії цього виду виявлено широкий спектр терпенових сполук, для яких описана антимікробна дія [8]. З огляду на це метою нашого дослідження було дослідити генетичний та біотехнологічний потенціал актиноміцетів із ризосфери *Thymus roegneri* К. Koch. aggr. та вивчити їхні властивості як потенційних агентів біологічного контролю та стимуляторів росту рослин.

### **Матеріали і методи**

Зразки ризосфери рослин *T. roegneri* К. Koch aggr. відбирали на схилах Нікитського хребта (44°33'40", 34°12'30") та зберігали при температурі 4°C.

Виділення актиноміцетів здійснювали трьома способами: I – наважку коренів 2 г поміщали в колбу зі 100 мл стерильної водопровідної води і струшували на шейкері 15 хв; II – наважку коренів 2 г поміщали в колбу з 100 мл 1,5 % водного розчину фенолу і струшували на шейкері 30 хв; III – наважку коренів 2 г прогрівали протягом 60 хв при 100°C, далі як у (I). Отримані суспензії в об'ємі 1 мл переносили в стерильні мікропробірки і висівали на чашки Петрі з середовищами ISP3, ISP4, з пропіонатом натрію, з хітином [11], Гаузе 2 [12], НВА [13]. Для пригнічення росту інших бактерій і грибів до середовища додавали налідиксову кислоту (25 мкг/мл) і ністатин (50 мкг/мл) [14]. Інкубу-

вали протягом 24 діб при 28°C. Колонії відбирали за характерним для актиноміцетів ростом та морфологією. Чисті культури ізолятів зберігали в середовищі TSB [14] з додаванням рівного об'єму 50 % розчину гліцерину при -20°C. Виділені штами актиноміцетів депоновані в Колекції культур мікроорганізмів–продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка.

Для вивчення антагоністичного потенціалу виділених ізолятів використали штами фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* IMB 8511, *Pseudomonas fluorescens* IMB 8573, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* IMB 4012, *Pectobacterium carotovorum* IMB 8982, *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB8003, *Agrobacterium tumefaciens* IMB 8628, *Erwinia amylovora* Mi2 та грибів *Fusarium oxysporum* IMB 54201, *Botrytis cinerea* IMB 2306, *Aspergillus niger* IMB 16706. Бактерії вирощували на LA, гриби на середовищі Сабуро [14].

Антибактерійні властивості ізолятів вивчали таким чином: по 6 ізолятів висівали уколком на чашки Петрі з ВС (вівсяне борошно – 40 г, агар – 18 г, водопровідна вода – 1000 мл, рН 7,5). На 7 добу росту колонії, що утворилися, заливали 0,7 % L-агаром [14], який містив 10<sup>9</sup> клітин/мл тест-культур. Фунгіцидну активність вивчали за допомогою методу подвійної культури. На 3 добу росту по центру агарової пластини викладали блок (Ø 6 мм) з 5-денним газоном гриба. Після інкубування в термостаті при 28°C (бактерії – 24 год, гриби – 48–72 год) вимірювали діаметр колоній, утворених актиноміцетами та діаметр зон затримки росту тест-культур. За відношенням діаметру зон пригнічення до діаметру колоній визначали антимікробну активність досліджуваних актиноміцетів, яку позначали як індекс активності (ІА). Експерименти виконували в трьох повторях. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel.

Для вивчення синтезу індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) ізоляти інокулювали в 10 мл середовища TSB та вирощували протягом 2 діб на качалці при 180 об/хв і температурі 28°C. Одержані прекультури в об'ємі 2 мл висівали в 30 мл ферментаційного середовища SG з додаванням 0,2 % триптофану [14] в 250 мл колбах Ерленмеєра та вирощували протягом 5 діб за тих самих умов. Відбирали 1 мл культуральної рідини та осаджували центрифугуванням протя-

гом 2 хв при 12 тис. об./хв. Відбирали 0,1 мл надосадової рідини та додавали рівний об'єм реактиву Сальковського [15]. Суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв в темряві. За наявності ІОК суміш набувала рожевого кольору. Як контроль до 100 мкл реактиву Сальковського додавали 100 мкл ІОК (концентрація 0,1 %).

Для вивчення синтезу сидерофорів ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашки Петрі з середовищем YEM, вирощували при 28°C протягом 7 діб. На сьому добу утворені колонії заливали 2 мл CAS-індикаторним розчином [16] та інкубували протягом 1 години за кімнатної температури. Колонії, які синтезували сидерофори, змінювали забарвлення середовища навколо колоній із блакитного на світло-жовтий, жовтий або фіолетовий колір.

Для вивчення солюбілізації ізоляти висівали уколком по 6 шт. на чашки Петрі з середовищем Муромцева [17] та вирощували при 28°C протягом 7 діб. Утворення зон просвітління навколо колоній вказувало на здатність солюбілізувати нерозчинні сполуки фосфору.

### Результати та обговорення

Із прикореневої зони тим'яну косматого *T. roegneri* К. Koch agg. виділено 91 штамп актиноміцетів, які були відмінні між собою за формою та забарвленням колоній, утворенням повітряного міцелію, наявністю і кольором розчинних пігментів. Майже 70 % досліджених ізолятів пригнічували ріст хоча б однієї тест-культури. Найбільша кількість ізолятів пригнічували збудника бактеріального опіку плодів *E. amylovora* (41,3 %), трохи більше половини з яких мали ІА менше 3. ІА від 3 до 6 мало 18,5 %, і лише 1,1 % ізолятів мали ІА більше 6. Трохи менше актиноміцетів затримували ріст іншої грамнегативної палички *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, що спричинює кутасту плямистість квасолі (35,6 %). Більшість антагоністів цього фітопатогену мали ІА не більше 6, і лише 1,1 % ізолятів мали вищу активність. Значно менша кількість ізолятів виявила антагоністичні властивості проти інших представників роду *Pseudomonas*. Зокрема, ріст *P. fluorescens* (збудник плямистостей та м'якої гнилі) пригнічувало 6,5 % ізолятів, а *P. syringae* (збудник обмороження та плямистостей широкого кола рослин) лише 5,4 %. ІА ізолятів щодо цих тест-культур був не вищим 6. Близько третини досліджених ізолятів затримували ріст таких фітопатогенних

бактерій, як *P. carotovorum* (збудник м'якої гнилі та чорної ніжки картоплі) і *X. campestris* pv. *campestris* (збудник судинного бактеріозу широкого кола сільськогосподарських рослин, особливо хрестоцвітих). 22–25 % ізолятів, які пригнічували ріст цих бактерій, мали ІА не більше 3. Вищий рівень активності (ІА 3–6) мали майже 10 % ізолятів, що пригнічували ріст *X. campestris* pv. *Campestris*, і 5,4 % антагоністів *P. carotovorum*. Бактерію *A. tumifaciens*, яка є причиною утворення ракових пухлин типу корончастих галів, пригнічувало 12,0 % досліджених ізолятів. Переважна більшість із них мали ІА не більше 3 (10,9 %).

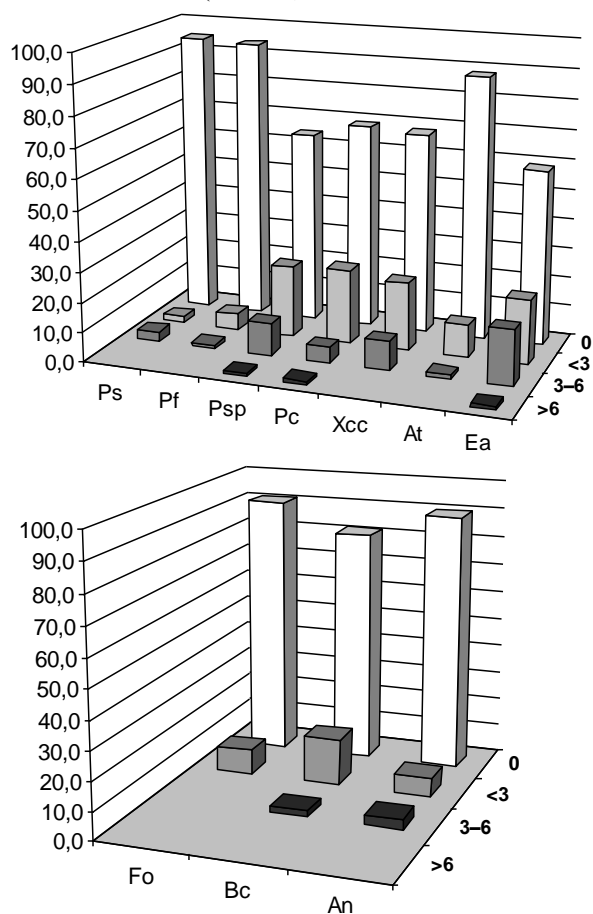


Рис. Антибактерійна (зліва) та антифунгальна (справа) активність штамів актиноміцетів із ризосфери *T. roegneri* K. Koch aggr. За віссю абсцис – ІА. За віссю ординат – кількість ізолятів, %. Ps – *P. syringae*, Pf – *P. fluorescens*, Psp – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, Xcc – *X. campestris* pv. *campestris*, At – *A. tumifaciens*, Ea – *E. amylovora*, Fo – *F. oxysporum*, Bo – *B. cinerea*, An – *A. niger*.

Майже 20 % досліджених ізолятів виявляли антифунгальну активність. Зокрема, 8,8 % штамів пригнічували ріст *F. oxysporum* (збудник трахіомікозного зів'язнення рослин), а їхній ІА був не більшим 3. Майже 10 % актиноміцетів були антагоністами *A. niger* (збудник аспергильозу людини, тварин, а також рослин, зокрема винограду), з них 3,3 % мали ІА 3–6, решта – не більше 3. Крім того, 17,5 % виділених ізолятів затримували ріст *B. cinerea* (сіра гниль), більшість із них (16,3 %) мали ІА менше 3.

Як було сказано раніше, актиноміцети можуть синтезувати ІОК і, таким чином, стимулювати ріст рослин [18]. У колекції виділених актиноміцетів було 49,5 % ізолятів, які на середовищі SG з триптофаном синтезували ІОК. Ексудат коренів рослин є природним джерелом триптофану, що може підсилювати синтез ІОК ризосферними мікроорганізмами. Розчинність природних сполук фосфору, заліза та інших елементів має важливе значення для мінерального живлення рослин та може слугувати альтернативою синтетичним добривам. Трохи більше чверті досліджених ізолятів в експериментах *in vitro* синтезували сидерофори, а 6,6 % були здатні солубілізувати фосфор.

Досліджені актиноміцети різнилися як за рівнем антимікробної активності, так і за спектром антагоністичних та рістстимулювальних властивостей (табл.). Зокрема, серед них були штам, які специфічно пригнічували ріст однієї тест-культури. Наприклад, штам 10–313 – *P. carotovorum* (причому ІА цього штаму становив  $12,0 \pm 0,3$ ). П'ять ізолятів мали лише антифунгальну активність. Один із цих штамів (10–8) пригнічував ріст лише *B. cinerea*, решта – *F. oxysporum* IMB 54201 і *B. cinerea* (наприклад, штам 10–43). Деякі ізоляти (10–11, 10–296, 10–31, 10–142, 10–143, 10–222) пригнічували більшість із використаних тест-культур, а ізолят 10–110 був антагоністом усіх тест-штамів. Крім того, окремі описані штам, поряд з антимікробними властивостями синтезували ІОК або сидерофори. Два ізоляти (10–29 і 10–127) виявляли всі досліджені рістстимулювальні властивості.

Таблиця. Антимікробні та рістстимулювальні властивості окремих штамів актиноміцетів із ризосфери *T. roegneri* K. Koch aggr.

№ штам	Ps*	Pf	Ps	Pc	X.cc	At	Ea	Fo	Bc	An	C	Φ	ЮК
10-8	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5±0,3	0			-
10-43	0	0	0	0	0	0	0	1,8±0,1	2,7±0,1	0	-	-	
10-313	0	0	0	12,0±0,3	0	0	0	0	0	0	-	-	+
10-11	0	3,7±0,1	1,7±0,1	2,6±0,1	1,4±0,1	1,5±0,1	3,4±0,1	0	1,2±0,1	0	-	-	+
10-296	0	2,7±0,2	6,4±0,2	4,0±0,2	3,7±0,2	2,5±0,1	4,2±0,1	1,2±0,1	0	0	-	-	+
10-31	0	0	1,3±0,2	2,5±0,1	1,3±0,2	0	0	1,4±0,1	1,7±0,2	1,2±0,1	-	-	-
10-142	0	0	3,6±0,2	3,3±0,1	2,3±0,1	1,6±0,1	3,1±0,1	3,0±0,2	2,1±0,1	2,3±0,1	-	-	+
10-143	0	0	2,2±0,2	4,0±0,1	2,0±0,1	0	4,2±0,1	3,3±0,2	3,5±0,2	2,6±0,3	-	-	+
10-222	0	0	2,7±0,1	2,3±0,1	2,0±0,2	1,5±0,1	2,5±0,2	2,1±0,1	2,1±0,1	3,3±0,2	-	-	-
10-110	4,1±0,1	2,8±0,1	4,6±0,1	2,2±0,2	4,6±0,1	3,2±0,1	7,3±0,3	1,4±0,1	1,4±0,1	1,1±0,1	+	-	+
10-29	0	0	1,4±0,2	0	0	0	1,7±0,1	0	0	0	+	+	+
10-127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+

Примітки: \* – скорочення, як в рис. 1, 2. С – синтез сидерофорів, Φ – солюбілізація фосфору, ЮК – синтез ЮК.

### Висновки

З'ясовано, що ризосферу *T. roegneri* K. Koch aggr. населяють актиноміцети з широким спектром антимікробних та рістстимулювальних властивостей, що робить їх корисними для росту і розвитку рослин. Ця робота, як і наші попередні дослідження [19, 20], свідчать, про те що з ризосфери рослин Кримського півострова можна виділити велику кількість актиноміцетів,

які мають значний біотехнологічний потенціал як продуценти біологічно активних сполук. Виділені ізоляти можуть бути також джерелом нових генів, що контролюють їх біосинтез. Такі властивості визначають перспективність виділених штамів актиноміцетів для розробки біологічних технологій захисту та сприяння росту рослин.

### Література

1. Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management // Ed. Dinesh K. Maheshwari. – Berlin: Springer, 2011. – 345 p.
2. Aktar Md.W., Sengupta D., Chowdhuru A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // Interdisc Toxicol. – 2009. – V. 2 (1). – P. 1–12.
3. Da Silva Sousa C., Fermio Soares A., da Silva Garrido M. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol // Sci. Agri. – 2008. – V. 65. – P. 50–55.
4. Grasso L., Martino D., Alduina R. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes // In: Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications / Ed. Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang. InTech. – 2016. – P. 177–198.
5. Sreevidya M., Gopalakrishnan S., Kudapab H., Varshney R.K. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea // Braz. J microb. – 2016. – V. 47. – P. 85–95.
6. Sousa J., Olivares F. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications // Chem. Biol. Technol. Agric. – 2016. – V. 3 (24). – P. 1–12.
7. Khamna S., Yokota A., Lumyong S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production // World J Microb. Biotech. – 2009. – V. 25. – P. 649–655.
8. Хльпенко Л., Работягов В., Марко Н. Интродукция *Thymus roegneri* K. Koch aggr. в Никитском ботаническом саду // Черноморск. бот. ж. – 2014. – № 10 (3). – С. 402–407.
9. Vnyan I., Abid A., Obied H. Antibacterial activity of carvacrol against different types of bacteria // J Nat. Scie. Res. – 2014. – V. 4, No. 9. – P. 13–16.
10. Braga P. Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activities // Giorn. It. Ost. Gin. – 2005. – V. 27 (7–8). – P. 263–268.
11. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты: учебное пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 79 с.
12. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Род *Streptomyces*. – М: Наука, 1983. – 245 с.
13. Zhang J. Improvement of an isolation medium for actinomycetes // Modern App. Sci. – 2011. – V. 5, N 2. – P. 124–127.
14. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Foundation. – 2000. – 634 p.
15. Sarwar M., Kremer R.J. Determination of bacterially derived auxins by a microplate method // Lett. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 20. – P. 282–285.

16. Verma V., Joshi K., Mazumdar B. Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species // Res. J Chem. Scie. – 2012. – V. 2 (11). – P. 26–29.
17. Muromtsev G.S. Some methods for studying the dissolution of calcium phosphates by microorganisms // Microbiologiya. – 1957. – V. 26. – P. 172–178.
18. Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. – 2010. – Eurasia J. BioSci. – V. 4. – P. 23–32.
19. Громико О. Антагоністичні властивості актиноміцетів прикореневої зони маслини європейської *Olea europaea* L. // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 59. – С. 209–215.
20. Raju R., Gromyko O., Fedorenko V., Luzhetskyy A., Muller R. Oleaceran: A novel spiro[isobenzofuran-1,2'-naphtho[1,8-bc]furan] isolated from a terrestrial *Streptomyces* sp. // Organic Lett. – 2013. – V. 15, Is. 14. – P. 3487–3489.

**GROMYKO O.M., TISTECHOK S.I., CHORNOBAI V.I., FEDORENKO V.O.**

*Ivan Franko National University of L'viv,*

*Ukraine, 79005, L'viv, Grushevskogo str., 4, e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua*

**ANTAGONISTIC AND PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITIES OF RHIZOSFERIC ACTINOMYCETES FROM *THYMUS ROEGNERI* K. KOCH AGGR.**

**Aim.** Actinomycetes as a source of biologically active compounds have broad potential of biotechnology, particularly in creating bioproducts to protect and plant growth promotion. The aim of this work was investigation of antagonistic and plant growth promotion properties of the actinomycete strains from *Thymus roegneri* K. Koch. aggr. rhizosphere.

**Methods.** Microbiological and genetic methods for investigation of the ability to synthesize antibiotic substances, plant hormones and other molecules. **Results.** We isolated 91 isolates and studied their antimicrobial properties against a wide range of phytopathogenic bacteria and fungi. About 70 % isolates inhibited the growth at least one of the used test-cultures. Antifungal activity was observed in 20 % isolates. In the collection was found 7 isolates with a wide range of antagonistic properties, and one strain was an antagonist to all used test-cultures. We found 45 % IAA, 23 strains of siderophore producers and 6 isolates were able to solubilize phosphates. **Conclusions.** Actinomycetes with a broad spectrum antimicrobial properties and growth promotion can be found in the *T. roegneri* K. Koch aggr. rhizosphere. The selected isolates were a source of new genes that control the biosynthesis of antibiotics, phytohormones and other bioactive molecules.

**Keywords:** actinomycetes, biocontrol, plant growth promoting.