

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК 579.873:631.461
© 2013

О.В. СИЩИКОВА,
кандидат біологічних наук

Криворізький ботанічний
сад НАН України

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СТРЕПТОМІЦЕТІВ ПРИРОДНИХ ГРУНТІВ ТА ТЕХНОЗЕМІВ

*Вивчено морфофізіологічні особливості і проведено ідентифікацію 58 штамів бактерій роду *Streptomyces* за 36 діагностичними ознаками, які включають морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості. Створено колекцію видів стрептоміцетів, яка дозволить проаналізувати видовий склад цього угруповання в ґрунтах та оцінити зміни в структурі ґрунтового мікробного комплексу стрептоміцетів у техноземах.*

Проблема зростаючого забруднення навколишнього середовища важкими металами потребує від ґрунтової мікробіології і агро-екології вивчення впливу цих полутантів на ґрунт і ґрунтові мікроорганізми [1, 11]. Високий ступінь адаптаційної пластичності стрептоміцетів дозволяє їм успішно існувати в ґрунтах за найрізноманітнішого техногенного навантаження, про що свідчить спроможність угруповання стрептоміцетів ґрунту в умовах забруднення важкими металами утворювати протеолітичні ферменти, меланоїдні пігменти, лектини, антибіотики та інші біологічно активні речовини [2–4]. Тому актуальним є проведення ідентифікації комплексу ґрунтових стрептоміцетів, структура якого відображає просторово-часове співвідношення деяких таксонів міцеліальних прокаріотних організмів, що сприяє виявленню загальних закономірностей їх розповсюдження в природних і техногенних субстратах [7]. Це й стало **метою наших досліджень.**

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом досліджень були 58 ізолятів стрептоміцетів, виділених з природних ґрунтів регіону: чорнозем звичайний малопотужний суглинистий балки Власова (Петровський район, Кіровоградська область), чорнозем південний солонцюватий середньопотужний, солончак гідроморфний і солонець автоморфний, які розташовані в районі балки

Свистунова (м. Кривий Ріг), та едафотопи відвалів Першотравневого кар'єру ПівнГЗК різного віку відсіпки і ступеня біологічної рекультивациі, едафотопи плесів і дамб хвостосховищ ПівнГЗК з різним рослинним покривом та промайданчика РЗФ ПівнГЗК. Для мікробіологічного посіву і подальшого виділення стрептоміцетів використовували тверде живильне середовище – крохмале-аміачний агар [10, 6]. Ідентифікацію відібраних до колекції культур стрептоміцетів проводили за 36 діагностичними показниками з використанням методичних указівок визначника актиноміцетів Г.Ф. Гаузе [9], опису видів актиноміцетів роду *Streptomyces* та комп'ютерної програми їх ідентифікації *StmId* [3], розробленої співробітниками Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України.

Експериментальні дані обробляли за загальноприйнятими методами параметричної статистики на 95%-вому рівні значимості за Б.О. Доспеховим [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження морфології спор у 58 виділених з ґрунтів культур стрептоміцетів за допомогою скануючого електронного мікроскопа показало, що вони мають форму від округлої до прямокутної і розташовані як поодинокі, так і зібрані у вигляді ланцюжків. Крім цього, 63,8 % досліджених культур мають гладку поверхню спор (рис.

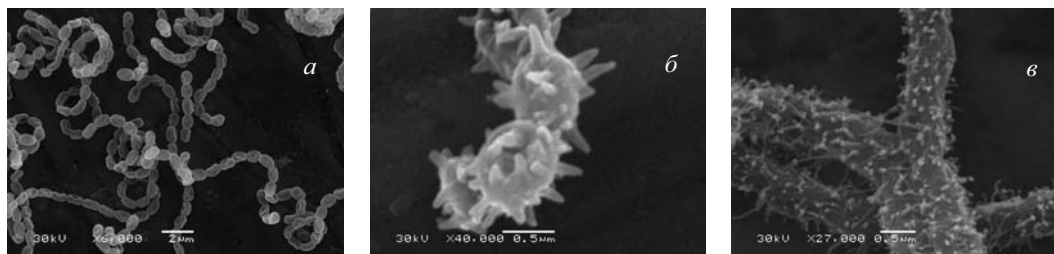


Рис. 1. Характер поверхні оболонки спор: а – гладка (*S.brasiliensis-1*); б – шипоподібна (*S.curacoii*); в – з волосками (*S.griseus*)

1,а), 24,1 % – зі шипами (рис. 1,б), 8,6 % – з буграми. І лише для культури під № 30 характерна наявність волосків на поверхні оболонки (рис. 1,в). У всіх ізолятів спори на повітряному міцелії зібрані в ланцюжки різної форми. Більшість виділених з ґрунтів стрептоміцетів мають прямі спороносії, розташовані моноподіально.

Серед культуральних властивостей для ідентифікації ґрунтових стрептоміцетів необхідним є вивчення кольору повітряного і субстратного міцелію, присутності розчинних і меланоїдних пігментів. Колір повітряного міцелію зумовлюється забарвленням оболонки спор, яке за Г.Ф. Гаузе найбільш характерно проявляється на синтетичних середовищах [9]. Так, за шкалою кольорів О.С. Бондарцева [2], на мінеральному агарі Гаузе-1 кількість ізолятів з білим забарвленням повітряного міцелію становила 29,3 %. Така сама кількість ізолятів має сірий колір і його відтінки. У решти колір повітряного міцелію – кремовий, рожево-ліловий, оранжево-ліловий, палевий, рожево-фіолетовий, каштановий. Для субстратного міцелію багатьох досліджуваних культур характерні відтінки коричневого та бурого кольорів.

Вивчення здатності виділених ізолятів утворювати розчинні пігменти показало, що 39,6 % культур мають таку властивість. Серед них 11 – утворюють пігменти коричневого, червоно-коричневого та бурого кольорів, 4 – рожевого (№ 31, 55, 58, 59), 2 – бордового (№ 8, 33), ізоляти № 1 та 13 – фіолетового, № 21 і 54 зеленого і № 19 – лимонно-жовтого на мінеральному агарі Гаузе-1.

Можливість штамів утворювати меланоїдні пігменти з'ясовували на пептонодріжджовому агарі зі залізом [5, 8, 12]. Ді-

лянки, забарвлені в темно-зелено-бурий, бурий або чорний колір, свідчили про те, що культура утворює меланоїдні пігменти. Серед вивчених ізолятів 63,7 % від загальної кількості виділених культур здатні утворювати меланоїдні пігменти.

Для ідентифікації гетеротрофних мікроорганізмів необхідно визначити, які вуглеводи і спирти забезпечують їх ріст. У зв'язку з цим вивчали здатність виділених ізолятів утилізувати вуглеводні (фруктозу, рамнозу, ксилозу, глюкозу, сахарозу, арабінозу, рафінозу) і багатоатомні спирти (сорбіт, манніт, інозит) та можливість рости без джерела вуглецю, яку встановлювали за інтенсивністю росту на середовищах з указаними сполуками. Так, використовувати глюкозу та сахарозу як джерело вуглецю здатні майже всі виділені культури, крім ізолятів № 59 та 58, у яких на середовищі з глюкозою і в культурі № 58 – зі сахарозою росту не відмічено. Решта досліджуваних культур у даних варіантах експериментів мала дуже добрий або добрий ріст (рис. 2,а I). Найменш придатним середовищем для росту виділених стрептоміцетів є середовище з ксилозою, тому що майже у 38 % ізолятів відсутній ріст на середовищі, з вмістом цього вуглеводню (рис. 2,а II). На середовищах з фруктозою, рамнозою, арабінозою та рафінозою відмічена різна інтенсивність росту культур стрептоміцетів. Так, використовуючи фруктозу як джерело вуглецю, більшість ізолятів мали дуже добрий або добрий ріст і лише у 11 ізолятів відмічено слабкий ріст, водночас у 14 культур – ріст відсутній (рис. 2,а III). Середовище з рамнозою виявилось досить придатним для зростання, оскільки відсутність росту спостерігали лише у 5 культур.

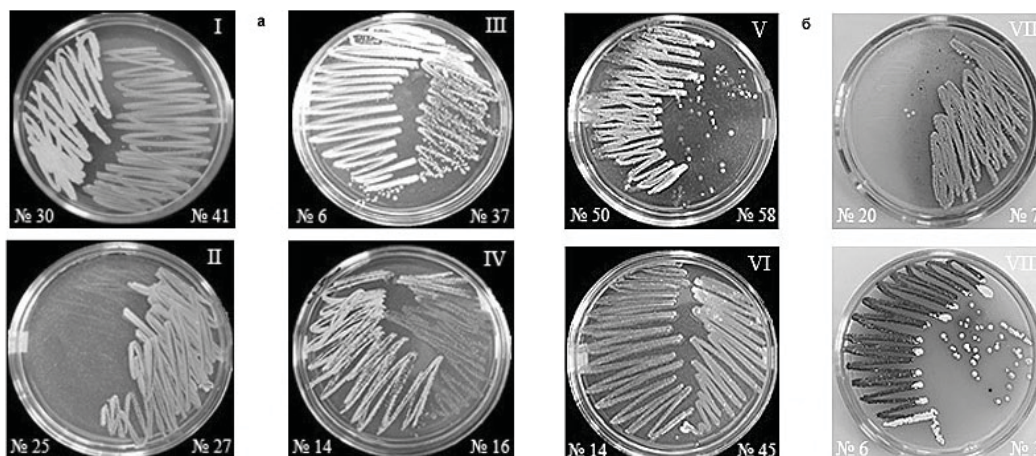


Рис. 2. Характер росту культур на середовищі з різними вуглеводами (а) та багатоатомними спиртами (б): I – глюкоза; II – ксилоза; III – фруктоза; IV – арабіноза; V – без джерела вуглецю; VI – інозит; VII – манніт; VIII – сорбіт

Вивчення інтенсивності росту культур з використанням арабінози та рафінози як джерело вуглецю показало наявність схожої тенденції їх використання. Так, нездатними до утилізації цих вуглеводів є ізоляти № 55, 59, 62 та 63, у той час як культури № 28, 58, 61 та 65 не утилізують рафінозу і тільки один ізолят № 36 – арабінозу. Всі інші ізоляти в основному добре росли на середовищах з цими вуглеводами. До життєдіяльності за відсутності джерела вуглецю здатні тільки декілька ізолятів № 48, 50, 53, 54, 55 та 56, які мали дуже добрий ріст на середовищі без вуглеводів, тоді як майже 30 % ізолятів від загальної кількості виділених культур неспроможні рости на цьому середовищі (рис. 2, б I).

Визначенням здатності виділених мікроорганізмів засвоювати багатоатомні спирти (сорбіт, манніт, інозит) доведено, що більшості ізолятів притаманна властивість їх утилізації. Для багатьох культур характерний дуже добрий або добрий ріст на середовищах з цими спиртами (рис. 2, б VI). Водночас у деяких ізолятів спостерігається слабкий ріст на середовищі з будь-яким із трьох спиртів і його відсутність на середовищі з двома іншими спиртами. Так, культури № 20, 28 та 55 мають слабкий ріст на середовищі зі сорбітом і не здатні утилізувати всі інші спирти, а ізолят № 63 має слабкий ріст у варіантах дослідів з маннітом та відсутність росту у разі викорис-

тання сорбіту та інозиту, і № 14, 26, 31, 44, 64 та 65 не утилізують тільки сорбіт (рис. 2, б VII). Усі інші ізоляти погано засвоюють тільки один зі спиртів, а на середовищах з іншими мають дуже добрий або добрий ріст.

Переважна кількість стрептоміцетів здатна засвоювати азотоорганічні сполуки, наприклад пептони і білки. Проведені дослідження дозволили встановити, що процес дезамінування амінокислот з утворенням аміаку здійснюють 64 % вивчених культур, а до розщеплення сірководню, здатні 57 % ізолятів. Деякі стрептоміцети здатні використовувати як кінцевий акцептор електронів не кисень, а нітрати. Висока активність нітратредуктази, яка обумовлює відновлення нітратів, притаманна 18 культурам. Утворення молекулярного азоту здійснювали тільки 12 культур з колекції.

Тести на здатність стрептоміцетів синтезувати позаклітинні ферменти показали, що майже всі вивчені культури проявляють амілолітичну, протеолітичну та целюлолітичну активність. Повна відсутність протеолітичних ферментів відмічена лише у культур № 61 і 65, а в ізолятів № 60 і 62 зафіксовано дуже слабе виділення лише одного з трьох ферментів у середовище. Так, у культури № 60 спостерігалася незначна колагеназна активність, а у № 62 слабка здатність до коагуляції молока.

Висновки

Аналіз одержаних даних з використанням комп'ютерної програми ідентифікації стрептоміцетів *StmID* [3], розробленої співробітниками Інституту мікробіології і вірусології НАН України, серед досліджених ізолятів дозволив визначити 36 видів роду *Streptomyces*, що сприяло створенню колекції їх штамів, яка використовується для з'ясування видового складу та змін структури угруповання стрептоміцетів у

техногенних і природних ґрунтах Криворіжжя. У подальшому вона може бути застосована для визначення фізіолого-біохімічних особливостей стійкості стрептоміцетів до дії різних абіотичних чинників та одного з показників у системі мікробної біоіндикації забруднених важкими металами ґрунтів і продуцентів біологічно активних сполук, з можливістю використання для потреб біотехнології.

Бібліографія

1. Благодатская Е.В. Влияние загрязнения соединениями свинца на микробиологическую активность серой лесной почвы под сеяным лугом / Е.В. Благодатская, Т.В. Пампура, И.Н. Богомолова // *Агрохимия*. – 2003. – № 4. – С. 74–78.
2. Бондарцев А.С. Шкала цветов / А.С. Бондарцев. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – 27 с.
3. Валагурова Е.В. Актиномицеты рода *Streptomyces*, описание видов и компьютерная программа их идентификации / Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. – К.: Наукова думка, 2003. – 618 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Доспехов Б.А. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
5. Евдокимова Г.А. Микроорганизмы тундровых и лесных подзолов Кольского Севера / Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2001. – 184 с.
6. Зенова Г.М. Антропогенные изменения структуры комплекса почвенных актиномицетов / Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцев // *Почвоведение*. – 1998. – № 6. – С. 680–688.
7. Иутинская Г.А. Математическое моделирование в микробиологическом мониторинге почв, загрязненных тяжелыми металлами / Г.А. Иутинская // *Почвоведение*. – 2005. – № 5. – С. 594–599.
8. Калакуцкий Л.В. Развитие актиномицетов / Л.В. Калакуцкий, Н.С. Агре. – М.: Наука, 1977. – 287 с.
9. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillum*, *Chainia* / Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др.]. – М.: Наука, 1983. – 248 с.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие [3-е изд., пер. и доп.] / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
11. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження / [Андріюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін.]. – К.: Обереги, 2001. – 233 с.
12. Anderson A.S. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera / A.S. Anderson, E.M.H. Wellington // *Int. J. Syst. Evolu. Microbiol.* – 2001. – Vol. 51. – P. 797–814.

Рецензент – доктор біологічних наук,
професор Ю.І. Грицан