

В.О. Романовська, П.В. Рокитко, Г.В. Гладка, О.Б. Таширев

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

СТІЙКІСТЬ ДО ДЕГІДРАТАЦІЇ ЕКСТРЕМОФІЛЬНИХ БАКТЕРІЙ З АНТАРКТИКИ ТА ГІПЕРСОЛОНІХ ВОДОЙМ

Мета. Визначити, чи виявляють резистентність до дегідратації мікроорганізми, які є стійкими до УФ-випромінювання. **Методи.** Об'єкти дослідження – екстремофільні бактерії (з островів Антарктики та з гіперсолоних водойм Ізраїлю і Криму). Стійкість бактерій до дегідратації визначали в герметичних ексікаторах, експозиція без доступу вологи 5 тижнів, температура – 22–25 °С, вологість – 1–4 %. УФ-опромінення бактерій проводили лампою БУФ-15 ($\lambda = 254$ нм) в діапазоні 40–2400 Дж/м². Після культивування визначали кількість бактерій до та після УФ-опромінення або висушування. **Результати.** Серед досліджених бактерій виявлено як резистентні до дегідратації штами (*Firmicutes*), так і чутливі до дегідратації (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*). Більшість штамів бактерій, які були стійкі до дегідратації, були також стійкими і до УФ-опромінення. Виживання після дегідратації у цих бактерій становило 6,32–55,26 %, а ЛД_{99,99} УФ 240–600 Дж/м². На противагу цьому, представники *Proteobacteria* були чутливими до даних екстремальних факторів: після дегідратації виживало 0–1,6 % клітин та ЛД_{99,99} УФ становила 80–180 Дж/м². **Висновки.** Отримані результати підтверджують гіпотезу, що між стійкістю бактерій до електромагнітного випромінювання (УФ) та їх резистентністю до дегідратації існує кореляція.

К л ю ч о в і с л о в а: Екстремофільні бактерії, резистентність, дегідратація, УФ-опромінення.

Дегідратація клітин та їх редукація справляють потужну стресову дію на клітину, в результаті якої не всі види бактерій здатні вижити. Ці процеси, виникаючи на межі клітини з повітрям, впливають на активність бактерій та їх розповсюдження в природі. Стійкість до дегідратації виявлено у вищих та нижчих рослин, дріжджів, бактерій, грибів та їхніх спор – тобто не існує окремої групи організмів, яка була б здатна протистояти цьому чиннику. Існує гіпотеза, що між стійкістю бактерій до електромагнітного випромінювання та їх резистентністю до дегідратації є кореляція. Так, є дані, що радіостійкі бактерії було ізольовано з екстремально сухих екосистем, на які до того ж чинилась інтенсивна дія сонячного УФ (скелі у пустелі Мохава, а також граніт у Сухих долинах Антарктиди) [1]. В даній роботі ми намагалися підтвердити цю гіпотезу – а саме, чи виявляють резистентність до дегідратації мікроорганізми стійкі до УФ-випромінювання.

Матеріали і методи. Об'єкти дослідження – антарктичні бактерії (15 штамів), виділені нами із зразків наземних біотопів (наскальна біоплівка кліфів, ґрунт, мох, лишайник тощо); бактерії (чотири штами) з екосистем узбережжя Мертвого моря (біоплівка кліфів, солоний ґрунт, лікувальна грязь) та два штами з лікувальної грязі Кримських солоних

озер. Всі штами знаходяться в колекції відділу біології екстремофільних мікроорганізмів ІМВ НАНУ. Для вирощування бактерій використовували глюкозо-картопляний агар (ГКА) і Nutrient Agar (NA) фірми HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Психротолерантні антарктичні ізоляти культивували за температури 18 °С, термотолерантні – за температури 30 °С та 42 °С.

УФ-опромінення бактерій проводили лампою БУФ-15 ($\lambda = 254$ нм) в діапазоні 40–2400 Дж/м², як описано нами раніше [2]. УФ-опромінення і подальшу інкубацію опромінених бактерій проводили в темряві, щоб уникнути фоторепарації.

Результати. Штами для експерименту підбирали таким чином, щоб досліджувані мікрорганізми відносились до різних видів, їх таксономічне положення наведено в нашій роботі [3]. Тобто, ми визначали стійкість до дегідратації у представників Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria і Bacteroidetes (таблиця). В експерименті використовували штами, ізольовані з різних екстремальних екосистем. В основному це були антарктичні штами, виділені із зразків наземних біотопів (наскальна біоплівка кліфів, ґрунт, мох, лишайник тощо). В роботі були також використані штами з екосистем узбережжя Мертвого моря (біоплівка кліфів, солоний ґрунт, лікувальна грязь) та з лікувальної грязі Кримських солоних озер.

Наразі, не існує чіткого кількісного критерію визначення понять «резистентність» або «чутливість» до стресових факторів взагалі і, зокрема у нашому випадку, до дегідратації. Можна говорити лише про те, що одні об'єкти є стійкішими або чутливішими від інших. Засновники методу вивчення резистентності бактерій до дегідратації V. Mattimore та J.R. Battista [4] запропонували, що, якщо після дегідратації кількість клітин, що вижили ≥ 10 %, їх вважають резистентними. З отриманих даних (таблиця, рисунок) видно, що найбільшу стійкість до дегідратації виявлено у бактерій філуму Firmicutes, виділених з екстремальних екосистем узбережжя Мертвого моря та лікувальної грязі Кримських солоних озер. У чотирьох штамів *Bacillus* – 1т3, 1т4, 2s1, 3s2 резистентність до дегідратації була майже однаково високою і становила 43–47 %. Також стійкими були штами *Staphylococcus* sp. 6т1 – 25,5 % та *Bacillus licheniformis* 7т1 – 23,0 %, а ЛД_{99,99} УФ становила 400–1500 Дж/м².

Серед бактерій з Антарктики найбільш стійким до дегідратації виявився штам *Rhodococcus fascians* 181n3 (філум Actinobacteria), виділений з помаранчевої біоплівки обростання на вершині вертикальної скелі, у якого стійкість (55,5 %) була на рівні штамів, виділених з екосистем узбережжя Мертвого моря та лікувальної грязі Кримських солоних озер. У *Arthrobacter scleromae* 28г5г стійкість становила 19,1 %. У більшості досліджених бактерій філуму Actinobacteria був приблизно однаковий рівень резистентності 6,3–10,2 %, а ЛД_{99,99} УФ 110–360 Дж/м². На противагу цьому, представники Proteobacteria та Bacteroidetes були надзвичайно чутливими до даних екстремальних факторів: після дегідратації виживало 0–1,6 % клітин, а ЛД_{99,99} УФ становила 80–180 Дж/м².

Загалом, серед досліджених бактерій виявлено як екстремально резистентні до дегідратації штами (Firmicutes), так і екстремально чутливі до дегідратації (Proteobacteria, Bacteroidetes). Більшість штамів бактерій, які були стійкі до дегідратації, були також стійкими і до УФ-опромінення. Таким чином, отримані результати підтверджують гіпотезу, що між стій-

Таблиця

**Резистентність досліджених бактерій до дегідратації та
УФ-опромінення**

№ штаму	Вид	% клітин, що вижили після дегідратації	ЛД _{99,99} УФ, Дж/м ²
Firmicutes			
1т3*	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	47,2	1300
1т4*	<i>Bacillus simplex</i>	43,0	1400
7т1*	<i>Bacillus licheniformis</i>	23,0	1500
6т1*	<i>Staphylococcus</i> sp.	25,5	400
2s1**	<i>Bacillus mojavensis</i>	47,0	1200
3s2**	<i>Bacillus simplex</i>	46,0	750
O-7	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	7,2	540
Actinobacteria			
O-1	<i>Micrococcus luteus</i>	10,2	220
O-3	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	10	165
O-6	<i>Microbacterium foliorum</i>	6,3	320
O-11	<i>Rothia</i> sp.	7,3	360
U11	<i>Frondehabitans</i> sp.	7,3	110
40r5	<i>Frondehabitans</i> sp.	0	110
28r5g	<i>Arthrobacter scleromae</i>	19,1	240
181n3	<i>Rhodococcus fascians</i>	55,5	320
Proteobacteria			
U1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	0	80
U10	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	0	135
O-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	120
O-8	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1,6	180
6r1g	<i>Serratia</i> sp.	0	80
Bacteroidetes			
U3	<i>Sphingobacterium anhuiense</i>	0	160

Примітка: *Штами, ізольовані з екосистем узбережжя Мертвого моря (Ізраїль). **Штами, ізольовані з лікувальної грязі солоних озер Криму (Україна). Всі інші штами виділено з екосистем Антарктики. ЛД_{99,99} УФ – доза УФ, при якій вижило 0,01 % клітин.

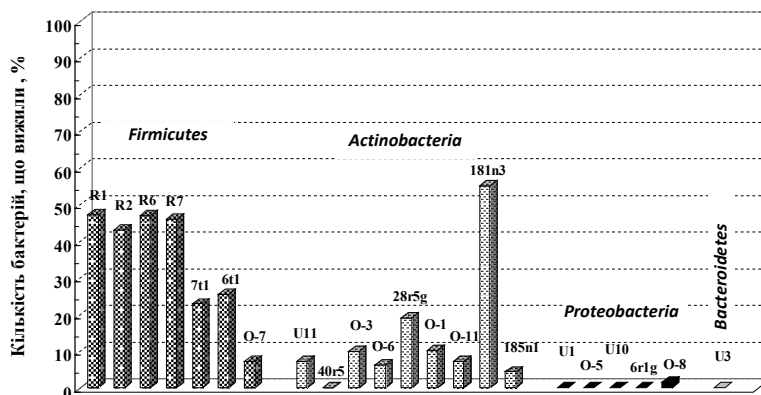


Рисунок. Життєздатність мікроорганізмів після дегідратації (відсоток від початкової кількості клітин)

Примітка. Над фігурами наведено номери штамів: O-7, 1т3, 1т4, 7т1, 6т1, 2s1, 3s2 (філум Firmicutes); O-1, O-3, O-6, O-11, U-11, 40r5, 28r5g, 181n3, 185n1 (філум Actinobacteria); U1, U10, O-5, O-8, 6r1g (філум Proteobacteria); U3 (філум Bacteroidetes).

кістю бактерій до електромагнітного випромінювання (УФ) та їх резистентністю до дегідратації існує кореляція.

Обговорення. Проблема стійкості бактерій до дегідратації, крім загальнобіологічного інтересу, привертає увагу ще й тому, що високорадіорезистентні до УФ- та γ -випромінювання штами *Deinococcus radiodurans* характеризуються також стійкістю і до дегідратації [4, 5]. Водночас, нестійкі до γ -електромагнітного випромінювання мутанти *D. radiodurans*, є чутливими до дегідратації [4]. Крім того, у *D. radiodurans* дегідратація викликає ушкодження, аналогічні тим, які індукує іонізуюче γ -випромінювання, тобто, крім пошкоджень важливих клітинних структур, відбувається також значна фрагментація ДНК [6, 7]. Одночасно, більшість хемоорганотрофних бактерій, які стійкі до γ -випромінювання, виявляють високу резистентність і до УФ-радіації.

Отже, до екстремальних умов (дегідратація, УФ- та γ -випромінювання) пристосовуються мікроорганізми, які здатні реалізувати певну стратегію виживання; перш за все, у них повинні функціонувати ефективні механізми репарації пошкоджень ДНК. Мікроорганізми антарктичних фітоценозів і наскальних біоплівкок обростання відіграють важливу роль у стабільності функціонування біоценозів Антарктики. Їх можна порівняти з радіостійкими бактеріями *Deinococcus radiophilus*, ізольованими з вивіреного граніту в Антарктиці [1] – тобто з екстремально сухих зразків навколишнього середовища, які піддавалися впливу сонячного ультрафіолету.

В цілому, у більшості бактерій із ґрунтів й фітоценозів Антарктики, а також з різних екосистем узбережжя Мертвого моря (біоплівка кліфів, солоний ґрунт, лікувальна грязь) та лікувальної грязі Кримських гіперсолоних озер спостерігається кореляція між резистентністю до дегідратації та УФ-опроміненням. Явище стійкості досліджених екстремофільних мікроорганізмів до таких факторів, як УФ-радіація та дегідратація, свідчить про наявність у них активних механізмів репарації пошкоджень ДНК.

Висновки. Отримані результати підтверджують гіпотезу, що між стійкістю бактерій до електромагнітного випромінювання (УФ) та їх резистентністю до дегідратації існує кореляція. У доступній нам літературі ми не знайшли аналогічних досліджень, тому вважаємо, що резистентність до дегідратації екстремофільних бактерій із Антарктики та гіперсолоних водойм виявлена вперше.

В.А. Романовская, П.В. Рокитко, Г.В. Гладка, А.Б. Таширев

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕГИДРАТАЦИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ АНТАРКТИКИ И ГИПЕРСОЛЁНЫХ ВОДОЁМОВ

Р е з ю м е

Цель. Определить, проявляют ли резистентность к дегидратации микроорганизмы, устойчивые к УФ-излучению. **Методы.** Объекты исследования – экстремофильные бактерии (с островов Антарктики и из гиперсолёных водоёмов Израиля и Крыма). Резистентность бактерий к дегидратации определяли в герметичных эксикаторах;

экспозиция без доступа влаги 5 недель, температура – 22–25 °С, влажность – 1–4 %. УФ-облучение бактерий проводили лампой БУФ-15 ($\lambda = 254$ нм) в диапазоне 40–2400 Дж/м². После культивирования определяли количество бактерий до и после УФ-облучения и после высушивания. **Результаты.** Среди исследованных бактерий обнаружены как резистентные к дегидратации штаммы (Firmicutes), так и чувствительные (Proteobacteria, Bacteroidetes). Большинство штаммов бактерий, которые были устойчивыми к дегидратации, были также устойчивыми и к УФ-облучению. Выживание после дегидратации у этих бактерий составило 6,32–55,26 %, а ЛД_{99,99} УФ 240–600 Дж/м². Представители Proteobacteria были чувствительными к данным экстремальных факторам: после дегидратации выживало 0–1,6 % клеток и ЛД_{99,99} УФ составляла 80–180 Дж/м². **Выводы.** Полученные результаты подтверждают гипотезу, что между устойчивостью бактерий к электромагнитному излучению (УФ) и их резистентностью к дегидратации существует корреляция.

К л ю ч е в ы е с л о в а: экстремофильные бактерии, резистентность, дегидратация, УФ-облучение.

V.A. Romanovskaya, P.V. Rokitko, G.V. Gladka, A.B. Tashyrev

*Zabolotny Institute of microbiology and virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kiev, 03143, Ukraine*

RESISTANCE TO DEHYDRATATION OF EXTREMOPHILIC BACTERIA FROM ANTARCTIC REGION AND HYPERSALINE RESERVOIRS

S u m m a r y

Purpose. To determine resistance to dehydration of bacteria resistant to UV irradiation. **Methods.** Objects of research – extremophilic bacteria (from Antarctic islands and hypersaline reservoirs of Israel and Crimea). Dehydration of bacteria was carried out in sealed desiccator; the exposure without access of moisture was 5 weeks, temperature – 22–25 °С, humidity – 1–4 %. UV irradiation of bacteria was carried out by lamp BUF 15 ($\lambda = 254$ nm) in the range of 40–2400 J/m². After cultivation irradiated and not irradiated strains (before and after UV irradiation and before and after drying) we determined the number of cells. **Results.** The extremely resistant to dehydration (Firmicutes) and extremely sensitive to dehydration (Proteobacteria, Bacteroidetes) strains was found among the studied bacteria. Most strains of bacteria that were resistant to dehydration were also resistant to UV irradiation. Survival after dehydration in these bacteria was 6.32–55.26 % and UV LD_{99,99} 240–600 J/m². Instead, representatives of Proteobacteria were extremely sensitive to these extreme factors: the cell survival was 0–1.6 % after dehydration and UV LD_{99,99} 80–180 J/m². **Conclusions.** The results support the hypothesis that between bacteria resistance to electromagnetic radiation (UV) and their resistance to dehydration there is a correlation.

К е y w o r d s: extremophilic bacteria, resistance, dehydration, UV irradiation.

1. Counsell T., Murray R.G.E. Polar lipid profiles of the genus *Deinococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1986; **36** (2): 202–6.
2. Romanovskaya V.A., Tashyrev A.B., Shilin S.O., Chernaya N.A., Rokitko P.V., Levishko A.S. Resistance of antarctic microorganisms to UV radiation. *Mikrobiol Zhurnal.* 2011; **73** (3): 3–8.

3. Romanovskaya V.A., Parfenova V.V., Belkova N.L., Sukhanova E.V., Gladka G.V., Tashyreva A.A. Phylogenetic analysis of bacteria of extreme ecosystems. *Mikrobiol Zhurnal*. 2014; **76** (3): 3–10.
4. Mattimore V., Battista J.R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* 1996; **178** (3): 633–7.
5. Sanders S.W., Maxcy R.B. Isolation of radiation-resistant bacteria without exposure to radiation. *Appl Environ Microbiol.* 1979; **38**: 436–9.
6. Asada S., Takano M., Shibasaki I. Deoxyribonucleic acid strand breaks during drying of *Escherichia coli* on a hydrophobic filter membrane. *Appl Environ Microbiol.* 1979; **37** (2): 266–73.
7. Dose K., Gill M. DNA stability and survival of *Bacillus subtilis* spores in extreme dryness. *Orig Life Evol Biosph.* 1995; **25** (1–3): 277–93.

Отримано 04.11.2015