

## АУТЭКОЛОГИЯ И ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ НАЗЕМНЫХ ЭКОСИСТЕМ АНТАРКТИКИ, ЭКВАДОРА И ИЗРАИЛЯ

*Н.В. Борзова, Е.В. Гудзенко, Г.В. Гладка,  
Л.Д. Варбанец, А.Б. Таширес*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев 03143, Украина  
e-mail: nv\_borzova@bigmir.net*

*Регионы с экстремальными условиями окружающей среды можно рассматривать в качестве системы с уникальным биоразнообразием и потенциалом. Цель. Установить диапазоны резистентности к УФ-облучению, температуре и концентрации NaCl, а также гликозидазную и протеолитическую активности бактерий, изолированных из наземных экосистем Антарктики, Эквадора и Израиля. Методы. Объектами исследования были 19 экстремотолерантных бактерий. УФ-облучение бактерий проводили лампой БУФ-15 ( $\lambda=254$  нм) в диапазоне 37–1440 Дж/м<sup>2</sup>. Температурный диапазон роста определяли при температуре 1–42 °С, галотолерантность – при концентрации NaCl 1–100 г/л среды. Энзиматические активности изучали в культуральном супернатанте. Для определения гликозидазных активностей использовали *p*-нитрофенильные субстраты, галактоманнан гуара и растворимый крахмал. В качестве субстратов для определения протеолитической активности использовали казеин и эластин. Результаты. Пигментированные антарктические микроорганизмы продемонстрировали более высокую резистентность к УФ, чем непигментированные. Культуры из высокогорных биотопов и засоленной почвы были устойчивы к УФ-дозам 400–1440 Дж/м<sup>2</sup>. Исследованные штаммы преимущественно относились к психротолерантным и умеренно-галофильным бактериям. Большинство изученных штаммов проявляли  $\alpha$ -амилазную и(или)  $\beta$ -манназную активности. Два штамма, 3271 и 3456, проявляли одновременно четыре и пять гликозидазных активностей соответственно. Казеинолитическая активность отмечалась у 17 культур, эластазная – у одной. Выводы. Экофизиологические характеристики изученных культур отражают их адаптацию к экстремальным условиям окружающей среды. Резистентными к УФ-радиации были как пигментированные, так и непигментированные микроорганизмы, большинство из них являются психротолерантными умеренными галофилами с  $\alpha$ -амилазной,  $\beta$ -манназной, казеинолитической и эластазной активностью.*

*Ключевые слова: психротолерантные бактерии, галофилы, УФ-резистентность, гликозидазы, протеазы.*

Микроорганизмы, в том числе бактерии, относятся к организмам с чрезвычайно широкими колонизирующими возможностями. Они заселяют все наземные, водные и подземные экологические ниши благодаря адаптации метаболических процессов для эффективного выживания в условиях физиологического стресса [1–3]. Экосистемы Антарктики характеризуются ограниченной трофической сложностью с преобладанием микроорганизмов в круговороте веществ [4]. Микромицеты и бактерии широко представлены в почве, воде и фитоценозах Антарктики и Субан-

тарктики [5, 6]. Низкие температуры, ограниченность воды и высокий фон УФ-излучения оказывают серьезное влияние на экосистему и биогеохимические процессы в регионе, что, в свою очередь, способствует выработке специфических механизмов резистентности у бактерий. Высокогорные биотопы, в частности Эквадора, и засоленные почвы Мертвого моря также заселяются микроорганизмами, устойчивыми к стрессовым физическим факторам. Значительные суточные колебания температур, кислотность почвы, интенсивность солнечной радиации позволяют выделять в таких условиях микроорганизмы, которые могут быть использованы в качестве модельных систем для астробиологии и биотехнологии [7].

Исследования микроорганизмов, выделенных из биотопов с экстремальными условиями, преследуют несколько теоретических и практических целей. Прежде всего, они расширяют наши области знания о биоразнообразии, его значении и стратегиях сохранения. Также позволяют изучить различные механизмы приспособления живых организмов к стрессовым условиям. Кроме того, такие микроорганизмы представляют интерес в качестве продуцентов вторичных метаболитов с новыми свойствами [8, 9]. В последние годы появились работы, посвященные изучению свойств протеинов термофильных, психрофильных, ацидо- и галофильных бактерий и грибов [10]. Жесткость структуры протеинов экстремофилов, сопровождающаяся их повышенной устойчивостью к воздействию факторов реакционной среды, создает новые возможности для интенсификации технологии биокатализа и биотрансформации.

Целью данной работы было исследовать экофизиологические особенности (резистентность к УФ-облучению, температуре, концентрации NaCl), а также гликозидазную и протеолитическую активности бактерий, изолированных из наземных экосистем Антарктики, Эквадора и Израиля.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были 19 изолятов аэробных хемоорганотрофных бактерий, выделенных из экстремальных экосистем: фитоценозов и почв низкотемпературного региона (Антарктика), фитоценозов и вулканических выбросов высокогорного региона (Эквадор) и гиперсолёных экосистем побережья Мертвого моря (Израиль). Список исследованных штаммов приведен в таблице 1.

Для выращивания бактерий использовали мясо-пептонный агар (МПА), глюкозо-картофельный агар (ГКА) и Nutrient Agar (NA) фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. bioMérieux (Франция). Для задержки роста микромицетов на 1 л среды вносили 50 мг нистатина. Психротолерантные антарктические штаммы культивировали при температуре 18–20 °С, мезофильные – 30 °С, термофильный – 42 °С.

Морфолого-культуральные характеристики колоний (форма, размер, окраска колоний) и клеток микроорганизмов (форма, размер, окраска по Граму) изучали методами экспериментальной микробиологии. Клетки исследовали используя световой микроскоп МИКМЕД-2 (ЛОМО, Россия).

Температурный диапазон роста штаммов определяли путем культивирования их на агаризованных питательных средах при +1 °С, +5 °С, +10 °С (до 20 суток), при +18 °С (до 10 суток), при +30 °С, +42 °С (до 2 суток). Учёт опыта проводили с 1–3 суточной периодичностью.

Таблица 1

**Бактерии, изолированные из экстремальных экосистем  
(Антарктика, Эквадор, Израиль)**

| № штамма   | Биотоп и условия выделения штамма   |
|------------|---|
|            | Западная Антарктика, о. Галиндез (2010 г.)<br>(температура выделения 1-5 °С, МПА)                           |
| 3271       | Трава <i>Colobanthus</i> (пункт Тр10)   |
| 3278       | Трава <i>Deshampcia antarctica</i> (пункт Тр11)   |
| 3458, 3456 | Мох (пункт 016)   |
| 3462, 3472 | Мох (пункт 017)   |
|            | Западная Антарктика, о. Галиндез (2011 г.)<br>(температура выделения 30 °С, НА, ГКА)                        |
| 3498       | Коричневые лишайники, (Тск-8)   |
| 3485       | Оранжевые накипные лишайники (Тск-0)  |
| 3477       | Почва коричневая, клейкая. Полигон (Lp 3. Gas-1)  |
|            | Восточная Антарктика (2011 г.)<br>(температура изоляции 30 °С, НА)  |
| 3228       | Моховые подушки <i>Bryum pseudotriquetrum</i> , земля Королевы Мод,<br>оазис Ширмахера, ст. Новолазаревская |
| 3230       |   |
|            | Высокогорные биотопы Эквадора (2013 г.)<br>(температура изоляции 30 °С, МПА)                                |
|            | Ла-Фаворита, горные джунгли, высота 1600м   |
| 3429       | Лишайник зелено-оранжевый   |
| 3441       | Лесная почва  |
|            | Вулкан Тунгурауа, высота 4200 м   |
| 3443       | Вулканический пепел   |
| 3444       | Смесь пепла с песком  |
|            | Горный массив, Папаякта, высота 4200 м  |
| 3449       | Почва черная с корнями  |
| 3453       | Лишайник с частицами скальной породы  |
|            | Ботсад «Las Orquideas», высота 950 м  |
| 3141       | Почва с перегнившей древесиной  |
|            | Побережье Мертвого моря (Израиль)   |
| 3237       | Соленая почва   |

Галотолерантность определяли при выращивании изолятов на агаризованных средах, содержащих 1, 10, 20, 25, 30, 50, 75 г NaCl/л среды при оптимальной температуре роста в течение 1–8 дней.

Устойчивость к ультрафиолетовому излучению определяли, как представлено ранее [11]. Источником УФ-излучения служила лампа БУФ-15 ( $\lambda=254$  нм). Дозу облучения (Дж/м<sup>2</sup>) устанавливали с помощью дозиметра ДАУ-81 (Россия). Продолжительность УФ-облучения – от 1 до 30 мин (37–1440 Дж/м<sup>2</sup>). УФ-облучение и дальнейшую инкубацию штаммов проводили в темноте, чтобы избежать фоторепарации. Выживаемость микроорганизмов, а также летальную дозу УФ (в %) оценивали как отношение клеток, выживших после различных доз УФ-облучения, к их исходному количеству в контроле. Летальную дозу ЛД<sub>99,99</sub> (доза УФ, при которой погибает 99,99 % клеток) определяли на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ-облучения.

Культивирование бактерий для исследования гликозидазной активности проводили глубинным способом на качалке со скоростью вращения 220 об/мин в течение 2–4 сут на среде следующего состава, г/л:  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  – 1,6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,15; мальтоза – 1,0; соевая мука – 20, pH – 6,0. Также в качестве источников углерода были использованы рамноза (5 г/л) и ксилоза (5 г/л). Для выявления протеолитической активности выращивание культур проводили в тех же условиях на среде, в г/л:  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  – 1,6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,15; мальтоза – 10,0; желатин – 10; pH – 6,0. Температура выращивания – 28 °С. По окончании ферментации биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, 10 мин. Энзиматические активности определяли в супернатанте культуральной жидкости.

Определение гликозидазных активностей культур проводили при помощи синтетических нитрофенильных субстратов: *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-рамнопиранозид, *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактопиранозид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкозаминид; *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминид; *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкуронид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-ксилопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозид; *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-фукопиранозид (“Sigma-Aldrich”, США) [12]. За единицу активности энзимов принимали такое их количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в условиях опыта.

$\beta$ -Маннаназную активность оценивали по количеству образовавшейся в результате гидролиза субстрата маннозы, которое определяли динитросалициловым методом, в качестве субстрата использовали галактоманнан гуара [13]. Реакционную смесь, содержащую 0,5 мл культуральной жидкости (КЖ) и 0,5 мл 1 % галактоманнана в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере (ФЦБ) pH 6,0, инкубировали 20 мин при 37 °С, затем добавляли 1 мл динитросалицилового реактива и кипятили 10 мин. Окраску оценивали спектрофотометрически при 540 нм. В качестве стандарта использовали маннозу. За единицу активности принимали такое количество энзима, которое способствует образованию 1 мкмоль маннозы за 1 мин в условиях опыта.

Предварительный скрининг на способность культур проявлять  $\alpha$ -амилазную активность проводили путем посева на картофельный агар, активность оценивали по отношению диаметра зоны гидролиза к диаметру колонии. Уровень  $\alpha$ -амилазной активности определяли динитросалициловым методом по количеству образовавшейся глюкозы, используя в качестве субстрата растворимый крахмал (1 %).

Общую протеолитическую активность определяли методом Ансона в модификации Петровой [14]. Эластазную активность определяли по расщеплению конго-рот эластина. Инкубационная смесь содержала 2,5 мл 0,1 ФЦБ pH 6,0; 20 мг эластина, окрашенного конго-рот, и 1 мл супернатанта КЖ бактерий. После 4 ч инкубации при 37 °С оценивали интенсивность окраски спектрофотометрически при 515 нм. За единицу активности принимали такое количество энзима, которое гидролизует 1 мг эластина за 1 час [15].

Все эксперименты проводили не менее чем в 3–5 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментальных серий осуществляли стандартными методами с использованием t-критерия Стьюдента при 5 % уровне значимости.

**Результаты.** У бактерий, изолированных из экстремальных экосистем (Антарктика, Эквадор, Израиль), были изучены морфолого-культуральные и экофизиологические свойства (табл. 2).

**Таблица 2**

**Морфологические и экофизиологические свойства исследованных микроорганизмов**

| № штамма | Морфотип                                |                                    | УФ, ЛД <sub>99,99</sub> Дж/м <sup>2</sup> | Рост в диапазоне |       |
|----------|---|------------------------------------|---|------------------|-------|
|          | Клетки (окраска по Граму, размер в мкм) | Колонии (пигментация, размер в мм) |   | NaCl, г/л        | Т, °С |
| 3271     | Гр+, овал., 2,5-1,7×1,2                 | Непигм., 4-5                       | 60  | 0,1-30           | 1-30  |
| 3278     | Гр+, овал., 1,7-1,4×1                   | Св.бурые, 3                        | 150                                       | 0,1-75           | 1-18  |
| 3458     | Гр-, палочки, 1,5-1,3×0,7               | Св.бурые, 2-3                      | 55  | 0,1-50           | 1-30  |
| 3456     | Гр-, палочки, 1,7-1,5×0,8               | Непигм., 1,5-3                     | 50  | 0,1-50           | 1-30  |
| 3462     | Гр+, овал., 1,6-1,4×0,7                 | Непигм., 1-2                       | 75  | 0,1-50           | 1-30  |
| 3472     | Гр-, палочки, 2,4-2×1,5                 | Св.бурые, 2-3                      | 60  | 0,1-50           | 1-30  |
| 3498     | Гр+, кокки, 3×3                         | Розовые, 3                         | 300                                       | 0,1-50           | 1-30  |
| 3485     | Гр+, овал., 2,4-2×1,4                   | Оранжевые, 2-4                     | 380                                       | 0,1-50           | 1-30  |
| 3477     | Гр+, овал., 1,8-1,6×1                   | Бледно-розовые, 3                  | 160                                       | 0,1-75           | 1-30  |
| 3228     | Гр+, кокки, 2,6×2,6                     | Оранжевые, 4-5                     | 300                                       | 0,1-75           | 5-30  |
| 3230     | Гр+, кокки, 3×3                         | Красные, 1-2                       | 900                                       | 0,1-50           | 5-30  |
| 3429     | Гр+, палочки, 6-2×1                     | Оранжевые, 5-8                     | 280                                       | 0,1-50           | 5-30  |
| 3441     | Гр+, палочки, 4-2×1,3                   | Непигм., 5-7                       | 400                                       | 0,1-30           | 5-30  |
| 3443     | Гр+, кокки, 2,5×1,5                     | Св.бурые, 7-9                      | 1000                                      | 0,1-100          | 5-42  |
| 3444     | Гр+, палочки 10-2×1,2                   | Непигм., 3-4                       | 1440                                      | 0,1-50           | 5-42  |
| 3449     | Гр-, овал., 0,8×0,5                     | Непигм., 8-9                       | 120                                       | 0,1-50           | 5-30  |
| 3453     | Гр+, палочки, 5-2×1,3                   | Св.бурые, 7                        | 1160                                      | 0,1-50           | 5-30  |
| 3141     | Гр+, палочки, 5-2×1                     | Св.бурые, 8                        | 800                                       | 0,1-50           | 5-42  |
| 3237     | Гр+, палочки, 1,7-2×1                   | Бурые, 5-15                        | 1250                                      | 0,1-100          | 18-50 |

Примечание: Гр+ – грамположительные клетки. Гр- – грамотрицательные клетки. Овал. – оваловидные палочки. Св.бурые – светло-бурые. Непигм. – непигментированные.

Все исследованные бактерии являются аэробами, хемоорганотрофами, пигменты в среду не выделяют. Большинство штаммов (79 %) – грамположительные палочковидные бактерии или оваловидные палочки и кокки, 21 % – грамотрицательные палочки.

Показано (табл. 2), что из 11 штаммов Западной Антарктики, о. Галиндез (2010-2011 гг.) и Восточной Антарктики (2011 г.) независимо от первичной температуры изоляции (1–5 °С или 30 °С) восемь росли в температурном диапазоне от 1 до 30 °С, два – от 5 до 30 °С, один – от 1 до 18 °С. Из исследованных штаммов высокогорных экосистем Эквадора четыре росли при температуре от 5 до 30 °С, у трех штаммов был достаточно широкий температурный диапазон – от 5–10 до 42 °С. Из 19 исследованных штаммов один (3237) рос в диапазоне температур 18–50 °С и один (3278) – в диапазоне от 1 до 18 °С.

Галотолерантность штаммов определяли по способности расти на агаризованных питательных средах, содержащих от 1 до 100 г NaCl/л среды. Как показано (табл. 2), из 19 исследованных штаммов 12 (63%) способны расти при концентрации 50 г NaCl/л среды; три штамма росли при концентрации 75 г NaCl/л среды. Наиболее устойчивыми к NaCl (100 г NaCl/л среды) были штаммы 3237 и 3443, изолированные из засоленной почвы (Побережье Мертвого моря) и вулканического пепла (Вулкан Тунгурау) соответственно.

Изучение устойчивости к УФ-облучению бактерий, доминирующих в экосистемах Западной и Восточной Антарктики, показало, что большинство пигментированных штаммов бактерий были резистентными к УФ-облучению (табл. 2). Высокорезистентным к УФ-облучению был краснопигментированный штамм 3230, изолированный из моховых подушек *Bryum pseudotriquetrum*, у которого  $LD_{99,99}$  составляла 900 Дж/м<sup>2</sup> (табл. 2, рис. 1). Резистентными к УФ ( $LD_{99,99}$  – 300–380 Дж/м<sup>2</sup>) были и другие пигментированные (оранжевые, розовые) изоляты (табл. 2, рис. 1).

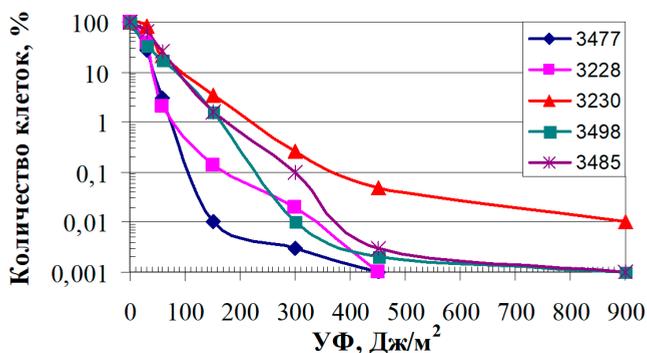


Рис. 1. Дозовые кривые выживаемости после УФ-облучения штаммов бактерий, изолированных из экосистем Западной и Восточной Антарктики

Примечание: допустимые отклонения не превышали 5%.

Чувствительными к УФ-облучению были непигментированные и светло-бурые бактерии (3271, 3278, 3456, 3458, 3462, 3472) из фитоценозов Западной Антарктики,  $LD_{99,99}$  для них варьировала в пределах 55–150 Дж/м<sup>2</sup> (табл. 1, рис. 2).

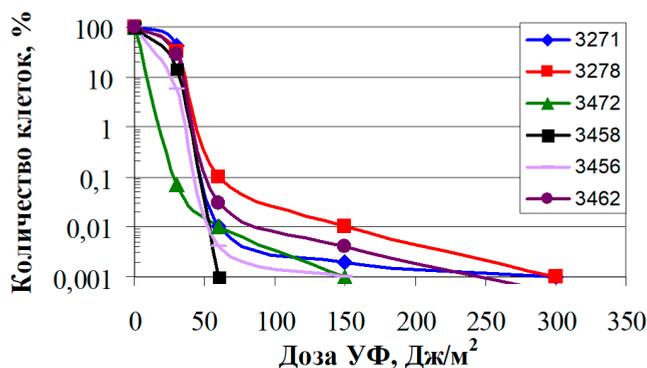
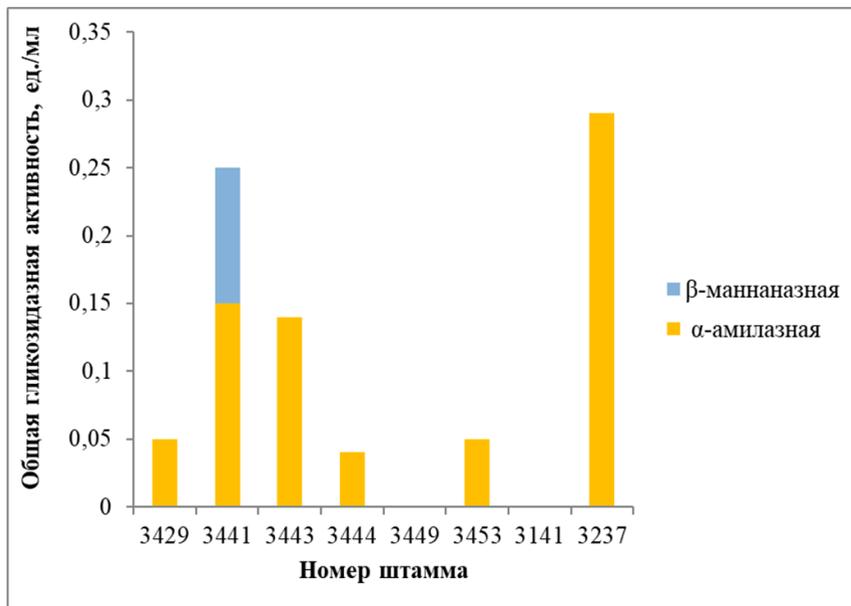


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости после УФ-облучения штаммов бактерий, изолированных из экосистем Западной Антарктики

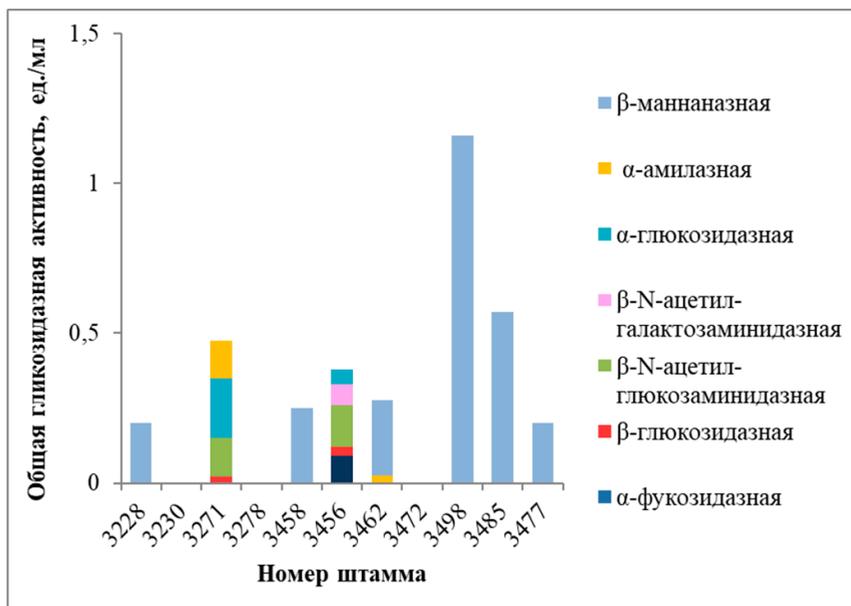
Примечание: допустимые отклонения не превышали 5%.

Культуры из высокогорных биотопов Эквадора и засоленной почвы Израйля показали значительно более высокую резистентность к УФ, чем антарктические штаммы. Только штамм 3449 был чувствителен к УФ-облучению, все остальные продемонстрировали УФ-устойчивость, причем 4 культуры (3443, 3444, 3453, 3237) – в диапазоне 1000–1440 Дж/м<sup>2</sup>.

**А**



**Б**



**Рис. 3.** Спектр гликозидазной активности бактерий из высокогорных районов Эквадора, побережья Мертвого моря (А) и психротолерантных антарктических культур (Б)

При культивировании штаммов на мясо-пептонном бульоне, глюкозо-картофельной среде и жидком сусле наблюдали активный рост культур, однако исследуемые внеклеточные гликозидазные и протеолитические активности отсутствовали. Поэтому в дальнейшем мы использовали синтетическую среду, в которую в качестве индуктора гликозидазных активностей добавляли соевую муку и мальтозу, а в качестве индуктора протеолитических ферментов – желатин. Мальтоза и соевая мука обеспечивали физиологические потребности всех изученных культур для роста. Однако спектры гликозидазной активности бактерий сильно варьировали в зависимости от источника выделения и штамма. Менее активной группой оказались бактерии, выделенные из высокогорных биотопов Эквадора и засоленной почвы побережья Мертвого моря (рис. 3А): шесть из восьми культур проявляли  $\alpha$ -амилазную и одна –  $\beta$ -маннаназную активности. При этом две культуры, выделенные из почвы с древесными остатками, не проявили ни одной из изученных гликозидазных активностей, хотя зачастую природные ниши, богатые на целлюлозы и гемицеллюлозы, являются перспективными источниками продуцентов глюконаз, амилаз, целлюлаз и маннаназ [10]. Психротолерантные культуры, выделенные преимущественно из мха, травы и лишайников, проявляли от одной до 5 ферментативных активностей (рис. 3Б). Наиболее часто отмечалась  $\beta$ -маннаназная активность (6 из 11 культур). Только две культуры проявляли одновременно 5 и 4 активности, показав способность отщеплять  $\alpha$ - и  $\beta$ -связанную глюкозу,  $\beta$ -связанные N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин, а также фукозу.

Большинство изученных штаммов проявляли внеклеточную казеинолитическую активность (рис. 4). В то время как эластазная активность была обнаружена только у одной исследованной культуры, выделенной из засоленной почвы (рис. 4).



Рис. 4. Протеолитическая активность бактерий

**Обсуждение.** Экстремальные факторы окружающей среды создают предпосылки для выработки у заселяющих такие биотопы микроорганизмов различных механизмов адаптации. Они демонстрируют способность расти при температуре ниже 0 и выше 70 °С, при лимитированных количествах углерода и воды, высоком и низком давлении, в гиперсоленых и кислых средах [2, 7, 9, 16, 17]. Изучение биоразнообразия таких экстремальных биотопов и свойств заселяющих их микроорганизмов имеет огромное теоретическое и практическое значение.

В последние десятилетия значительное количество работ [1, 4, 6] посвящено исследованию микробного разнообразия Антарктики. Показано, что в ее наземных экосистемах преобладают психротолерантные бактерии и дрожжи, в то время как в водной среде доминируют психрофильные штаммы [16, 18]. Анализ температурного диапазона роста антарктических бактерий показал, что 10 из 11 исследованных нами штаммов были психротолерантными и лишь один – умеренным психрофилом. Четыре штамма бактерий, выделенных из высокогорных экосистем Эквадора, росли при температуре от 5 до 30 °С, что позволяет отнести их к психротолерантным, у 3-х штаммов температурный диапазон был шире, от 5–10 до 42 °С. Один штамм (3237), изолированный из засоленной почвы побережья Мертвого моря, рос в диапазоне температур 18–50 °С: он может быть отнесен к термотолерантным микроорганизмам.

Еще одной особенностью экониш, из которых были выделены изученные штаммы, является высокий фон солнечной радиации. В последние годы роль УФ-излучения как фактора, влияющего на устойчивость живых систем, все возрастает. Связано это как с истощением озонового слоя в результате антропогенного влияния в целом, так и с его разрушением над Антарктикой в частности [19]. Известно, что в результате УФ-облучения в клетке происходит образование пиримидиновых димеров, гидратация цитозина и урацила, разрыв водородных связей ДНК, образование органических перекисей и др., что приводит к летальному эффекту [1]. Изучение прокариотических и эукариотических микроорганизмов, устойчивых к влиянию этого фактора, позволяет понять механизмы адаптации к экстремальным условиям.

В наших экспериментах отмечено, что все антарктические пигментированные штаммы бактерий были резистентными к УФ-облучению. Наиболее устойчивым к УФ ( $LD_{99,99} - 900 \text{ Дж/м}^2$ ) был краснопигментированный штамм 3230, изолированный из моховых подушек *Bryum pseudotriquetrum*. Непигментированные и светло-бурые бактерии (штаммы 3271, 3278, 3456, 3458, 3462, 3472) из фитоценозов Западной Антарктики, изолированные при температуре 1-5 °С, были чувствительными к УФ-облучению. Высокую устойчивость к УФ-воздействию показали и штаммы, выделенные из почвенно-растительных образцов Эквадора, что может быть обусловлено высоким уровнем солнечной радиации в высокогорных районах региона. Максимальные показатели  $LD_{99,99}$  были отмечены у непигментированного штамма, выделенного из вулканического пепла, а также буропигментированного штамма из засоленной почвы (1440 и 1250  $\text{Дж/м}^2$  соответственно). Существует точка зрения, согласно которой пигментированные штаммы характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию УФ, так как каротиноиды и другие УФ-защитные пигменты поглощают

определенную часть солнечной энергии и повышают свою устойчивость к стрессам окружающей среды, что показано для дрожжей и бактерий [7, 17]. Наши данные в целом это подтверждают, хотя следует заметить, что наиболее резистентный штамм (3444) не был пигментирован. В данном случае механизм адаптации может быть связан с наличием других фотозащитных молекул, экспрессией антиоксидантных ферментов, а также включением механизмов фотореактивации для восстановления фотоповреждений ДНК [20, 21].

Наиболее резистентные антарктические, эквадорские и израильский штаммы по уровню ЛД<sub>99,99</sub> сравнимы с известными радиостойчивыми краснопигментированными кокками *Deinococcus radiophilus* и *Deinococcus radiodurans*, изолированными из выветренного, подвергаемого воздействию природного (солнечного) ультрафиолета, гранита в Антарктике [22, 23]. Бактерии этого рода характеризуются высокой резистентностью к стрессовым факторам среды, особенно к ультрафиолетовому и ионизирующему излучению.

Известно, что экстремотолерантность микроорганизма к одному стрессовому воздействию часто сопровождается устойчивостью и к другим факторам [11]. Наши исследования показали, что все высокорезистентные штаммы бактерий, наряду с термофильностью либо психротолерантностью, были умеренными галофилами и росли на среде, содержащей 5–10 % NaCl.

Полученные результаты также свидетельствуют о том, что грамположительные бактерии более резистентны к УФ, чем грамотрицательные (табл.2).

Экстремофильные бактерии представляют большой интерес в качестве продуцентов биотехнологически важных вторичных метаболитов (энзимов, антибиотиков) [8, 10]. Адаптация термофилов и психрофилов привела к их способности синтезировать протеины, устойчивые к широкому диапазону температур. Энзимы термофилов проявляют повышенную устойчивость при высоких температурах, в то время как психрофильные энзимы, активные при низких температурах, позволяют экономить энергию в процессах промышленного катализа. Активные психротолерантные продуценты деградирующих энзимов представляют собой ценный инструмент переработки отходов в регионах с умеренным и полярным климатом [9].

Анализ энзиматической активности показал наличие протеолитической активности у 17 и гликозидазной – у 14 из 19 изученных штаммов. Большинство культур проявили только по одной гликозидазной активности, преобладающими были  $\alpha$ -амилазная и  $\beta$ -маннаназная активности. Кроме них, у двух штаммов отмечали  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазные,  $\alpha$ -фукозидазную,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазную и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазную активности. Учитывая, что большинство из штаммов были выделены из почвенно-растительных образцов, подобная активность вполне вписывается в концепцию зависимости энзиматической активности культуры от источника выделения [9]. На сегодняшний день описаны психрофильные и психротолерантные продуценты многих гидролитических энзимов [10]. Изученные бактерии также демонстрируют высокий потенциал экстремофильных продуцентов.

Таким образом, в результате проведенной работы были описаны и охарактеризованы бактерии, выделенные из биотопов с экстремальными условиями окружающей среды. Экофизиологические характеристики культур отражают их адаптацию к температурному режиму и УФ-воздействию в регионе. Некоторые из выделенных штаммов можно рассматривать в качестве продуцентов биотехнологически важных энзимов.

## АУТЕКОЛОГІЯ І ГІДРОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ НАЗЕМНИХ ЕКОСИСТЕМ АНТАРКТИКИ, ЕКВАДОРУ ТА ІЗРАЇЛЯ

*Н.В. Борзова, О.В. Гудзенко, Г.В. Гладка,  
Л.Д. Варбанець, О.Б. Таширеєв*

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

### Резюме

Регіони з екстремальними умовами оточуючого середовища можна розглядати як системи з унікальним біорізноманіттям та потенціалом. **Мета.** Встановити діапазони резистентності щодо УФ-опромінення, температури та концентрації NaCl, а також глікозидазну та протеолітичну активності бактерій, ізольованих з наземних екосистем Антарктики, Екватору та Ізраїля. **Методи.** Об'єктами дослідження були 19 екстремотолерантних бактерій. УФ-опромінення бактерій проводили лампою БУФ-15 ( $\lambda=254$  нм) у діапазоні 37–1440 Дж/м<sup>2</sup>. Температурний діапазон росту визначали за температури 1–42 °С, галотолерантність – за концентрації NaCl 1–100 г/л середовища. Ензиматичні активності вивчали в культуральному супернатанті. Для визначення глікозидазних активностей використовували *n*-нітрофенільні субстрати, галактоманан гуару та розчинний крохмаль. Як субстрати для визначення протеолітичних активностей використовували казеїн та еластин. **Результати.** Пігментовані антарктичні мікроорганізми продемонстрували вищу резистентність щодо УФ, ніж непігментовані. Культури з високогірних біотопів та засоленого ґрунту були стійкі до УФ-доз 400–1440 Дж/м<sup>2</sup>. Досліджені штами переважно відносилися до психротолерантних та помірно-галофільних бактерій. Більшість досліджених культур проявляли  $\alpha$ -амілазну та(або)  $\beta$ -мананазну активності. Два штами, 3271 та 3456, проявляли одночасно чотири та п'ять глікозидазних активностей відповідно. Казеїнолітична активність відмічалася у 17 культур, еластазна – у однієї. **Висновки.** Екофізіологічні характеристики досліджених культур відображають їхню адаптацію до екстремальних умов оточуючого середовища. Резистентними до УФ-радіації були як пігментовані, так і непігментовані мікроорганізми, більшість з яких є психротолерантними помірними галофілами з  $\alpha$ -амілазною,  $\beta$ -мананазною, казеїнолітичною й еластазною активністю.

*Ключові слова:* психротолерантні бактерії, галофіли, УФ-резистентність, глікозидази, протеази.

# AUTECOLOGY AND HYDROLYTIC ACTIVITY OF TERRESTRIAL ECOSYSTEMS MICROORGANISMS FROM THE ANTARCTIC, ECUADOR AND ISRAEL

*N.V. Borzova, O.V. Gudzenko, G.V. Gladka,  
L.D. Varbanets, A.B. Tashyrev*

*<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

## Summary

Regions with extreme environmental conditions can be considered as a system with unique biodiversity and potential. **The aim** was to determine resistance range to UV-irradiation, temperature and concentration of NaCl, the glycosidase and proteolytic activity of bacteria isolated from terrestrial ecosystems of Antarctica, Ecuador and Israel. **Methods.** The objects of study were 19 extreme-tolerant bacteria. UV-irradiation of bacteria was performed with a BUF-15 lamp ( $\lambda = 254$  nm) in the range of 37–1440 J/m<sup>2</sup>. The temperature range of growth was determined at a temperature of 1–42 °C, halotolerance – at NaCl concentration of 1–100 g/l. Enzymes activities were studied in the culture supernatant. To determine glycosidase activities, *p*-nitrophenyl substrates, galactomannan guar and soluble starch were used. Casein and elastin were used as substrates for the determination of proteolytic activity. **Results.** Antarctic pigmented microorganisms showed a higher resistance to UV than non-pigmented. Cultures from highland biotopes and saline soils were resistant to UV-doses of 400–1440 J/m<sup>2</sup>. Investigated strains mainly belonged to psychotolerant and moderately halophilic bacteria. Most of the strains showed  $\alpha$ -amylase and/or  $\beta$ -mannanase activity. Two strains, 3271 and 3456, exhibited simultaneously four and five glycosidase activities respectively. Caseinolytic activity was observed in 17 cultures, elastase – in one. **Conclusions.** Ecophysiological characteristics of the studied cultures reflect their adaptation to extreme environmental conditions. Both pigmented and non-pigmented microorganisms were resistant to UV-radiation, most of them are psychrotolerant moderate halophiles with  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -mannanase, caseinolytic and elastase activity.

*Keywords: psychrotolerant bacteria, halophiles, UV-resistance, glycosidase, protease.*

1. Nunez-Pons L, Avila C, Romano G, Verde C, Giordano D. UV-protective compounds in marine organisms from the Southern Ocean. *Mar Drugs*. 2018; 16:336.
2. Dhaulaniya AS, Balan B, Kumar M, Agrawal PK, Singh DK. Cold survival strategies for bacteria, recent advancement and potential industrial applications. *Arch Microbiol*. 2019; 201(1):1–16.
3. Ventosa A. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*. 1998; 2(3):297–304.
4. Yergeau E, Schoondermark-Stolk SA, Brodie EL, Dejean S, DeSantis TZ, Gonçalves O, Piceno YM, Andersen GL, Kowalchuk GA. Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *ISME J*. 2009; 3(3):340–351.
5. Yergeau E, Newsham KK, Pearce DA, Kowalchuk GA. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environ Microbiol*. 2007; 9(11):2670–2682.

6. Dennis PG, Newsham KK, Rushton SP, O'Donnell AG, Hopkins DW. Soil bacterial diversity is positively associated with air temperature in the maritime Antarctic. *Sci Rep*. 2019; 9(1):2686.
7. Pulschen AA, Rodrigues F, Duarte RT, Araujo GG, Santiago IF, Paulino-Lima IG, Rosa CA, Kato MJ, Pellizari VH, Galante D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiologyopen*. 2015; 4(4):574–588.
8. Dumorne K, Cordova DC, Astorga-Elo M, Renganathan P. Extremozymes: A potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*. 2017; 27(4):649–659.
9. Cabrera MA, Blamey JM. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biol Res*. 2018; 51(1):37.
10. Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Neifar M, Fava F. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 7907–7913.
11. Romanovskaya V, Avdeeva L, Gladka G, Pritula I, Kharkhota M, Tashyrev A. Resistance to extremal factors of microorganisms of coastal ecosystems of Dead sea. *Mikrobiol Z*. 2013; 75(3):3–11.
12. Chaplin ME, Kennedy JE. (Eds.). *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Washington, Oxford IRL Press. 1986; 228 p.
13. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 1959; 31:426–428.
14. Petrova IS, Vintsyunayte MN. [Determination proteolytic activity enzyme preparations of microbial origin]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 1966; 2(1):322–327. Russian.
15. Trombridg GO, Moon HD. Purification of human elastase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972, 141(3): 928–931.
16. Santiago M, Ramirez-Sarmiento CA, Zamora RA, Parra LP. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Front Microbiol*. 2016; 7:1408.
17. Dieser M, Greenwood M, Foreman CM. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arct Antarct Alp Res*. 2010; 42:396–405.
18. Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1975; 39(2): 144-167.
19. Wessel S, Aoki S, Winkler P, Weller R, Herber A, Gernandt H, Schrems O. Tropospheric ozone depletion in polar regions A comparison of observations in the Arctic and Antarctic. *Tellus B*. 1998; 50:34–50.
20. Zenoff VF, Sineriz F, Farias ME. Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(12):7857–7863.
21. Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(1):133–191.
22. Counsell T, Murray RGE. Polar lipid profiles of the genus *Deinococcus*. *Intern J Syst Bacteriol*. 1986; 36(2):202–206.
23. Diaz B, Schulze-Makuch D. Microbial survival rates of *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans* under low temperature, low-pressure, and UV-irradiation conditions, and their relevance to possible Martian life. *Astrobiology*. 2006; 6(2):332–347.

Отримано 14.05.2019