

## Експериментальні праці

УДК 579.26

**В.А. Романовская, Л.В. Авдеева, Г.В. Гладка,  
И.Р. Припула, М.А. Хархота, А.Б. Таширев**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, ДО3680, Украина

### УСТОЙЧИВОСТЬ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИБРЕЖНЫХ ЭКОСИСТЕМ МЁРТВОГО МОРЯ

На микроорганизмы прибрежных экосистем Мёртвого моря действуют такие экстремальные факторы, как УФ радиация, высокая температура и солёность, а также малое содержание доступной воды. Изучена устойчивость к этим факторам микроорганизмов, выделенных из экосистем этой зоны (вертикальные крутые обрывы вокруг Мёртвого моря, глинисто-соляная равнина и чёрная высоко минерализованная грязь). Из этих экосистем изолированы аэробные, хемоорганотрофные, термотолерантные, умеренно галофильные бактерии, которые согласно морфолого-физиологическим свойствам подобны видам *Gracilibacillus halotolerans*, *Salimicrobium album* и роду *Caryorhapon*. Все изоляты росли при 0-10 % NaCl в среде (один штамм – при 15 % NaCl), в диапазоне 30-50 °С. Резистентность к УФ радиации проявили все исследованные бактерии. Летальные дозы УФ ( $LD_{50}$  и  $LD_{99,99}$ ) для спорообразующих штаммов рода *Gracilibacillus* составляли соответственно 100-170 и 1100-1500 Дж/м<sup>2</sup>; для штамма *Salimicrobium* 6т1 (не образует спор) – 70 и 400 Дж/м<sup>2</sup>; для образующего филоменты (или трихомы) штамма 1т4 (род *Caryorhapon*) – 150 и 1400 Дж/м<sup>2</sup>. Несколько штаммов рода *Gracilibacillus* оказывали сильное антагонистическое действие на условно-патогенные тест-культуры *Staphylococcus aureus* 209р и *Candida albicans* УКМ Y-690. Можно предположить, что устойчивость микроорганизмов прибрежных экосистем Мертвого моря к экстремальным факторам сформировалась под влиянием абиотических (физико-химических) факторов, типичных для этого региона.

**Ключевые слова:** Экстремофильные бактерии, Мёртвое море, прибрежные экосистемы, галотолерантность, термотолерантность, устойчивость к УФ радиации, антагонизм.

Мёртвое море расположено на 400 м ниже уровня Мирового океана. Оно образовалось под воздействием мощных тектонических сил и является частью Сирийско-Африканского разлома. Солёность воды достигает в южной части моря – 30%. В воде Мертвого моря выявлены различные группы галофильных микроорганизмов: аэробные и анаэробные хемоорганотрофные прокариоты, простейшие, цианобактерии [9, 15]. Среди аэробных прокариот большинство изолятов из Мертвого моря относится к семейству *Halobacteriaceae* (домен *Archaea*) [13]. В этой экосистеме обнаружены также грамотрицательные и грамположительные умеренно галофильные виды бактерий (домен *Bacteria*) [4, 12]. Умеренно галофильные грамотрицательные бактерии (роды *Pseudoalteromonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* и *Salegentibacter*) и грамположительные бактерии (роды *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Staphylococcus* и *Tetragenococcus*) были обнаружены также в солёных экосистемах в Александрии (Египет) [8]. Что касается микрофлоры побережья Мёртвого моря, то она менее изучена. Поэтому цель нашей работы – дать количественную характеристику устойчивости микроорганизмов прибрежных экосистем Мёртвого моря к экстремальным факторам, таким как солёность, температура и УФ радиация.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были бактерии, изолированные нами из различных экосистем побережья Мёртвого моря.

Образцы для микробиологических исследований отбирали в прибрежной зоне Мёртвого моря (Израиль). Для выделения бактерий использовали образцы, отобранные на клифе (клифы – вертикальные обрывы высотой 100-150 м, окружающие чашей Мёртвое море) и на побережье Мёртвого моря, которое представляет собой глинисто-соляную равнину. Подготовку образцов для посева проводили стандартными методами. Для выявления аэробных хемоорганотрофных бактерий использовали мясо-пептонную агаризованную среду (МПА). Для подавления роста микромицетов в среду добавляли нистатин (50 мг/л). Посевы культивировали при 42 °С (до 10 суток).

© В.А. Романовская, Л.В. Авдеева, Г.В. Гладка, И.Р. Припула, М.А. Хархота, А.Б. Таширев, 2013

*Количество бактерий* в образцах определяли методом посева последовательных десятикратных разведений образцов на питательную среду и культивировали их при 42°C. Подсчитывали различные морфотипы колоний в чашках, где общее количество колоний не превышало 50. Таким образом, учитывали морфотипы только тех видов, которые доминируют в исследованном природном образце. Результаты учитывали ежедневно в течение 5 сут.

*Морфолого-культуральные свойства.* Для выделения чистых культур использовали бактерии, доминирующие в образцах. Для этого с чашек, где общее количество колоний не превышало пятидесяти, отбирали единичные колонии. Выделение чистых культур осуществляли общепринятыми методами. Морфологию клеток изучали при микроскопии живых и окрашенных по Граму препаратов стандартными методами. Споры выявляли методом негативного окрашивания и по методу Пешкова [3]. Основным критерием для определения различных морфотипов колоний служила совокупность следующих признаков: пигментация, выделение водорастворимого пигмента, образование внеклеточной слизи, консистенция, размер (мм), наличие воздушного и субстратного мицелия и другие характерные признаки.

*Физиолого-биохимические свойства* бактерий изучали, используя наборы для идентификации бактерий (тест-системы) API Coagure (номер по каталогу 20 900) и API 20A (номер по каталогу 20 300) фирмы bioMérieux SA (Франция), согласно инструкциям производителя.

*Температурный диапазон роста* бактерий определяли при культивировании их при различной температуре (от 18°C до 70°C, в течение 5 сут.) на МПБ (мясо-пептонный бульон) в пробирках (рабочий объём 5 мл) в стационарных условиях.

*Галотолерантность* определяли по резистентности к NaCl (г/л среды: 0, 20, 50, 100, 150, 200, 250) при посеве бактерий штрихом на чашки, содержащие указанные концентрации NaCl.

*Устойчивость к ультрафиолетовому излучению (УФ-С).* Десятикратные разведения (от  $10^{-2}$  до  $10^{-7}$ ) односуточных бактериальных суспензий наносили монослоем (по 0.05-0.1 мл) на чашки Петри с агаризованной средой (МПА) и равномерно растирали шпателем по всей поверхности. Открытые чашки помещали на расстоянии 1 м от источника облучения (лампа БУФ-15,  $\lambda=254$  нм). Длительность УФ облучения составляла от 1 до 60 мин (40 - 2400 Дж/м<sup>2</sup>). Дозу облучения (Дж/м<sup>2</sup>) определяли с помощью дозиметра ДАУ-81. После облучения чашки инкубировали при температуре 42°C. УФ облучение и дальнейшую инкубацию облученных бактерий проводили в темноте, чтобы избежать фоторепарации. Подсчет выросших на чашках колоний проводили через 1-2 суток и определяли количество бактерий, выживших после УФ облучения (в пересчете на 1 мл микробной суспензии). Количество клеток в исходной суспензии (до УФ облучения) определяли путем высева бактериальной суспензии из тех же последовательных десятикратных разведений на МПА. Выживаемость бактерий после УФ облучения (а также летальную дозу УФ) оценивали по изменению процентного содержания выживших клеток от их исходного количества. Чтобы сравнить чувствительность к УФ различных монокультур, на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычисляли ЛД<sub>90</sub> и ЛД<sub>99,99</sub> – дозы УФ, при которых погибает 90 и 99,99 % клеток, соответственно.

*Антагонистическую активность* определяли методом отстроченного антагонизма. В качестве тест-культур были использованы условно-патогенные бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25592, *Staphylococcus aureus* 209p, *Pseudomonas aeruginosa* 4141, а также дрожжи *Candida albicans* УКМ У-690. Для культивирования бактериальных тест-культур использовали глюкозо-картофельный агар (ГКА) и мясо-пептонный агар (МПА), для дрожжей – солодовое сусло агаризованное (СА). Суспензию тест-культур готовили по стандарту ГИСК им. Тарасевича. В качестве базовой среды при изучении антагонизма использовали среду Гаузе-2: бульон Хоттингера – 30 мл, пептон – 5г, NaCl – 5г, глюкоза – 10г, агар-агар – 30г, дистиллированная вода до 1 л. Для этого по центру чашки на питательную среду наносили исследуемые бактерии так, чтобы выросла одна колония (~3 сут.). Затем к ней радиальными штрихами подсевали суспензию тест-культуры. Посев (штрих) вели от центра чашки к периферии. Инкубировали в термостате (37°C, 1 сут.). Зоны задержки роста тест-культур измеряли после 24 часов инкубации. Отсутствие роста тест-культуры по штриху (через 24 час) указывало на антагонистическое действие исследуемых бактерий. Если тест-культура растет по всему штриху, это

свидетельствует об отсутствии антагонизма [1, 2]. Степень антагонистической активности оценивали по величине зон задержки роста тест-культур (менее 10 мм – низкий антагонизм, 10-15 мм – средний, 15-25 мм – высокий, более 25 мм – очень сильный антагонизм).

**Результаты и их обсуждение.** Образцы из прибрежных экосистем Мёртвого моря (табл. 1) рассевали на среды, содержащие соли Мёртвого моря (3 % или 27,5 %), а также на контрольную среду (без солей). При высокой концентрации соли (27,5 %) рост бактерий отсутствовал. Количество бактерий, а также количество бактериальных морфотипов было одинаковым при посеве образца на среды с 3 % солей Мёртвого моря и без солей. В целом, по количеству бактерий и их морфотипов прибрежные экосистемы Мёртвого моря значительно беднее экосистем других регионов (например, побережье Чёрного моря, побережье Антарктиды и т.п.), что определяется, видимо, действием экстремальных факторов в исследованном регионе. Это, прежде всего, высокое содержание в них солей, повышенный уровень солнечного облучения, температурный фактор, в результате которого глинисто-солёная равнина, клифы и воздух прогреваются до 40-60 °С и выше. В результате действия высокой температуры происходит интенсивное испарение воды Мёртвого моря и над поверхностью моря постоянно образуется облако пара, которое распространяется на близлежащие экосистемы (засоленные клифы и глинисто-соляная равнина). Это обеспечивает водой микрофлору экосистем вследствие конденсации паров при ночном понижении температуры.

Из исследованных образцов, отобранных в прибрежных экосистемах Мёртвого моря, изолировано 15 штаммов бактерий (табл. 1). Практически во всех образцах (как на клифе, окружающем Мёртвое море; так и в лечебной грязи) выявлены одни и те же морфотипы бактерий.

Таблица 1

**Характеристика исследованных прибрежных экосистем Мёртвого моря и количество бактерий в них**

№	Экосистема	Количество в 1 г образца, доминантных		№№ Изолированных штаммов
		бактерий	морфотипов	
1	Клиф вокруг Мёртвого моря, который состоит из камней, сцементированных глиной, содержащей 5-10 г органического вещества / кг	$2.6 \cdot 10^5$	3	1т1, 1т2, 1т3, 1т4, 1т5, 1тк3, 1тк4
6	Поверхностный слой солёного грунта, отобранный около ручья, который течёт через глинисто-соляную равнину в сторону Мёртвого моря	$1.4 \cdot 10^3$	2	6т1, 6т2, 6тк1, 6тк2
7	Чёрная высоко минерализованная грязь, отобрана там же. Представляет высокодисперсное коллоидное вещество, пластичное на ощупь, используется как лечебная грязь	$3.3 \cdot 10^3$	3	7т1, 7тк1, 7т2, 7тк3

Для дальнейшей работы было отобрано 8 штаммов, которые доминируют в исследованных образцах и представляют все выявленные виды. Все они являются аэробными хемоорганотрофными микроорганизмами. Из них у шести штаммов обнаружены эндоспоры. Споробразующие штаммы на жидкой среде в стационарных условиях образуют на поверхности среды плотные, складчатые плёнки. Эндоспоры у изученных штаммов подобны таковым у *Bacillus megaterium*: овальные, клетку не раздувают, их расположение центральное или терминальное. У восьми штаммов изучали устойчивость к экстремальным факторам (галотолерантность, термотолерантность, устойчивость к УФ излучению), которые могли сформироваться как адаптивная реакция на действие абиотических факторов, характерных для прибрежных экосистем Мёртвого моря.

Галотолерантность штаммов определяли по способности расти при различных концентрациях NaCl (от 0 до 20 %). Как следует из представленных данных (табл. 2), исследованные штаммы росли при 0-10 % NaCl в среде, из них только один (штамм 6т1) рос при 0-15 % NaCl. Т.о., штаммы, изолированные из прибрежных экосистем Мёртвого моря, были умеренно галофильными бактериями. К таковым обычно относят микроорганизмы, которые растут в среде,

содержащей от 3 % до 15 % NaCl (14). Они широко распространены в различных местах обитания, таких как гиперсолёные озера, солёные почвы, водоемы солеварен, соляные шахты.

Таблица 2

**Рост изолятов из прибрежных экосистем Мёртвого моря при различных концентрациях NaCl в среде**

№ штамма	Рост микроорганизмов при концентрации NaCl, %				
	0	5	10	15	18
1т2	++	++	+	-	-
1т3	++	++	+	-	-
1т4	++	++	+	-	-
1т5	++	++	+	-	-
6т1	++	++	++	+	-
6т2	++	++	+	-	-
7т1	++	++	+	-	-
7тк3	++	++	+	-	-

**Примечание.** «++» – интенсивный рост, «+» – хороший рост, «-» – отсутствие роста

У изолированных бактерий изучен температурный диапазон роста. Все исследованные штаммы росли в диапазоне 30-50 °С, при 55 °С вырос только один штамм, т.е. они являются термотолерантными (табл. 3).

Таблица 3

**Температурный диапазон роста изолятов из прибрежных экосистем Мёртвого моря**

№ штамма	Рост микроорганизмов при температуре					
	18°C	30°C	42°C	50°C	55°C	60°C
1т2	-	+	++	++	-	-
1т3	-	+	++	++	-	-
1т4	-	+	++	++	-	-
1т5	-	+	++	++	-	-
6т1	-	+	++	++	-	-
6т2	-	+	++	++	-	-
7т1	-	+	++	++	+	-
7тк3	-	+	++	++	-	-

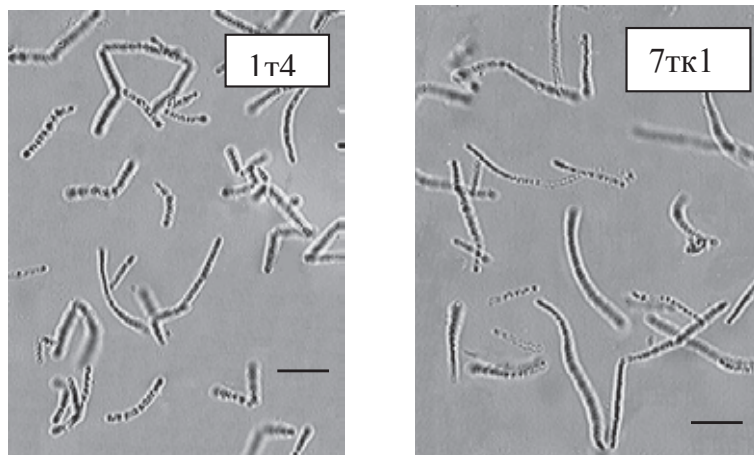
**Примечание.** Штаммы выращивали на жидкой среде в пробирках в стационарных условиях. «+» – рост в виде тонкой, рыхлой, гладкой плёнки; «++» – рост в виде плотной, складчатой плёнки; «-» – рост отсутствует.

Изучение морфолого-культуральных свойств бактерий, изолированных из прибрежных экосистем Мёртвого моря, показало, что они представлены тремя морфотипами бактерий:

1. Штаммы 1т2, 1т3, 1т5, 1тк3, 1тк4, 6т2, 6тк1, 7т1, 7тк3 образуют крупные, светло-бурые (иногда непигментированные) колонии, тестообразные, тусклые, морщинистые, круглые, правильной или неправильной формы, с неровными краями. Клетки – грамположительные палочки размером 1.5-2.0×0.7-1.0 мкм, подвижные, образуют эндоспоры. Штаммы различаются по размерам колоний (5-20 мм), их форме и консистенции, а также по размерам клеток. По основным морфолого-физиологическим признакам эти штаммы подобны умеренно галофильным видам: *Bacillus marismortui*, изолированному из воды Мёртвого моря [4], *B. salexigens* [7], который впоследствии был реклассифицирован как *Salibacillus salexigens* (16), *Gracilibacillus halophilus* [5], выделенному из солёной почвы (Китай) и *Gracilibacillus halotolerans*, изолированному из солёного озера (Great Salt Lake, Utah, США) [16]. От *Gracilibacillus halophilus* [5] штаммы описанного морфотипа, отличаются тем, что не растут при температуре выше 50 °С и концентрации NaCl более 15 %. В отличие от *Bacillus marismortui* они способны расти при концентрации в среде NaCl менее 1 %. Поэтому они более подобны умеренно галофильному виду *Gracilibacillus halotolerans*, [16]. Филогенетическая линия *Gracilibacillus halotolerans*: *Bacteria*; phylum *Firmicutes*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Gracilibacillus*.

2. Штаммы 1т1, 1т4, 7тк1 образуют мелкие (1-3 мм), гладкие, слабо выпуклые, блестящие, колонии, при старении приобретают серый оттенок. Клетки грамположительные, споры отсутствуют, прямые или изогнутые палочки, образуют сегментированные нити (трихомы или

филоменты), 1,5-2,0×10-30 мкм, трихомы неподвижные (рис. 1). Трихомы распадаются на более короткие нити и далее на отдельные клетки, у которых наблюдается кувыркающееся движение, длина единичной клетки 1,0-2,0 мкм. Умеренно галофильные термотолерантные бактерии, аэробы, хемоорганотрофы. По основным диагностическим признакам эти штаммы не представляется возможным причислить к ряду известных таксонов, представители которых образуют филоменты, трихомы, или удлинённые клетки. От цианобактерий штаммы 1т1, 1т4, 7тк1 отличаются тем, что они грамположительны; от миксобактерий – отсутствием скользящего движения и плодовых тел, а также окраской по Граму; от актинобактерий – отсутствием ветвления клеток, воздушного мицелия или конидий. По диагностическим морфолого-культуральным признакам штаммы 1т1, 1т4, 7тк1 подобны штаммам рода *Caryophanon* [6]. Однако мы не нашли сведений относительно галотолерантности штаммов *Caryophanon*. Представители этого рода обитают в различных природных экосистемах, они изолированы из экскрементов животных, снега Тибетского плато (Китай), цианобактериальных матов Балтийского моря (Финляндия), осадков Желтого моря (Южная Корея), производственных сточных вод (Китай). Аспорогенный род *Caryophanon* филогенетически отдаленно связан с *Bacillus subtilis* [6]. Описано два вида данного рода: *Caryophanon latum* и *Caryophanon tenue*. Их филогенетическая линия: *Bacteria*; phylum *Firmicutes*; *Bacillales*; *Planococcaceae*; *Caryophanon*.



**Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия живых клеток штаммов рода *Caryophanon* (1т4 и 7тк1), образующих трихомы (масштаб равен 5 мкм).**

3. Штаммы 1тк1, 6т1, 6тк2, 7т2 образуют белые, гладкие, выпуклые, маслянистые, блестящие, мелкие (1-3 мм) колонии. Клетки – грамположительные кокки, 2,0-2,5 мкм, подвижные, эндоспоры отсутствуют. По основным морфолого-физиологическим признакам подобны умеренно галофильным коккам *Marinococcus halotolerans* [11] и *Marinococcus albus* [10]. От оранжево-пигментированного *Marinococcus halotolerans* [11] штаммы данной группы отличаются отсутствием пигментации. Они более близки виду *Marinococcus albus*, впоследствии реклассифицированному [10] как *Salimicrobium albus*. Филогенетическая линия *Salimicrobium albus*: *Bacteria*; phylum *Firmicutes*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Salimicrobium*.

Таким образом, изолированные из прибрежных экосистем Мёртвого моря умеренно галофильные бактерии подобны *Gracilibacillus halotolerans*, *Salimicrobium albus* и штаммам рода *Caryophanon*.

Мы предположили, что, поскольку прибрежные экосистемы Мёртвого моря практически всегда открыты для Солнца, в них должны присутствовать бактерии, устойчивые к УФ излучению. Поэтому изучали устойчивость к УФ облучению бактерий, доминирующих в прибрежных экосистемах Мёртвого моря. Резистентность к УФ радиации проявили все исследованные бактерии (рис. 2). Для сравнения на рис. 2 приведены соответствующие данные для радиочувствительного штамма *E. coli* Bs-1. Чтобы сравнить чувствительность к УФ различных монокультур из прибрежных экосистем Мёртвого моря, на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычисляли ЛД<sub>90</sub> и ЛД<sub>99,99</sub> – дозы УФ, при которых погибает 90 % и 99,99 % клеток, соответственно (табл. 4).

Летальные дозы УФ ( $LD_{90}$  и  $LD_{99,99}$ ) для спорообразующих штаммов рода *Gracilibacillus* составляли, соответственно 100-170 и 1100-1500 Дж/м<sup>2</sup>; для *Salimicrobium* 6т1 (не образует спор) – 70 и 400 Дж/м<sup>2</sup>; для образующего трихомы штамма 1т4 (род *Caryophanon*) – 150 и 1400 Дж/м<sup>2</sup> (табл. 4).

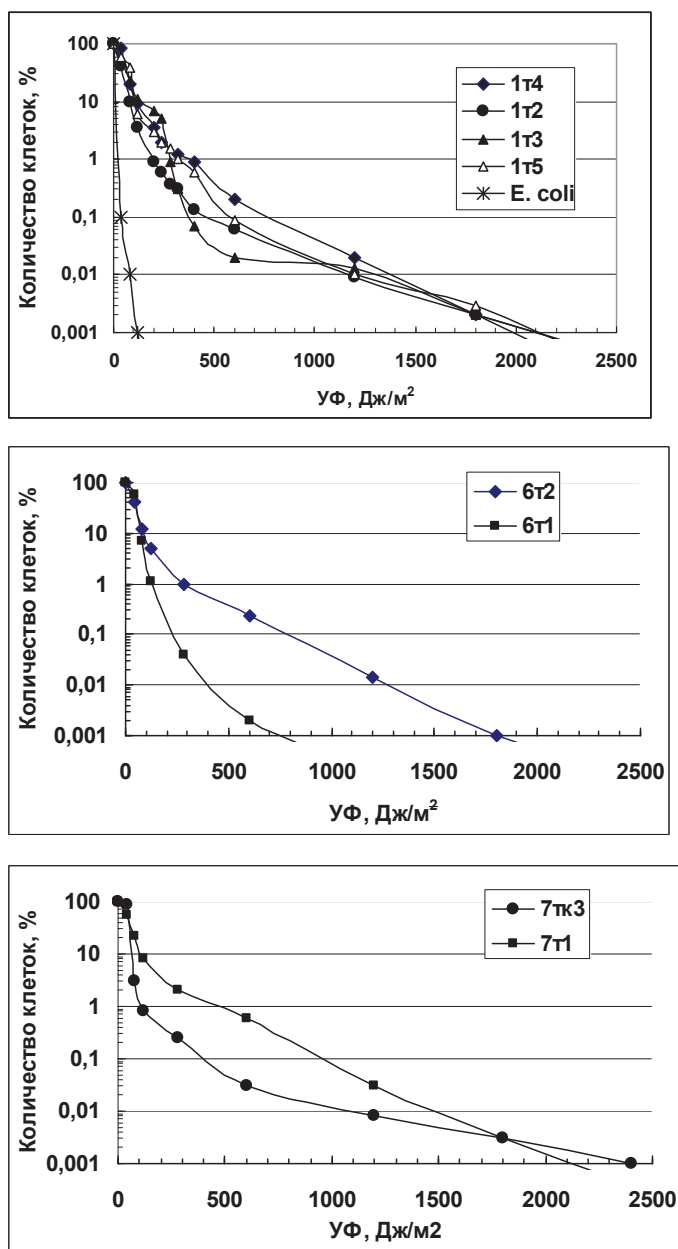


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости штаммов, изолированных из прибрежных экосистем Мёртвого моря после УФ облучения.

**Примечание.** Для сравнения приведена устойчивость к УФ коллекционного штамма *E. coli* Bs-1. В легенде обозначены номера штаммов из прибрежных экосистем Мёртвого моря и коллекционный штамм *E. coli*.

Нами была исследована антагонистическая активность изолированных спорообразующих бактерий по отношению к тест-культурам условно патогенных микроорганизмов, представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Установлено, что исследуемые штаммы спорообразующих бактерий не проявляли антагонистическую активность по отношению к грамотрицательным бактериям



*Escherichia coli* ATCC 25592 и *Pseudomonas aeruginosa* 4141 (зоны задержки роста отсутствовали) (табл. 5). Этот факт возможно объясняется отсутствием представителей данных видов в изученных прибрежных экосистемах Мёртвого моря, в результате чего у аборигенных бактерий не мог сформироваться тип взаимодействия (в нашем случае, антагонизм) по отношению к ним. Штаммы 6т2 и 7т1 не оказывали антагонистического действия на все тест-культуры (табл. 5). Штаммы 1т2, 1т3 и 1т5 (род *Gracilibacillus*) проявляли выраженный антагонизм по отношению к *Staphylococcus aureus* 209р и *Candida albicans* УКМ У-690, из них штамм 1т2 проявил наибольшее антагонистическое действие относительно *Candida albicans* УКМ У-690 и *Staphylococcus aureus* 209р (зоны задержки роста 30 и 28 мм, соответственно) (табл. 5). Т.о., согласно полученным результатам, штаммы подобные *Gracilibacillus halotolerans* 1т2, 1т3 и 1т5, изолированные из прибрежных экосистем Мёртвого моря, являются сильными антагонистами по отношению к *Staphylococcus aureus* 209р и *Candida albicans* УКМ У-690.

Таблица 4

**Летальные дозы УФ (ЛД<sub>90</sub>, ЛД<sub>99,99</sub>), для бактерий, изолированных из прибрежных экосистем Мёртвого моря**

№ штамма	ЛД <sub>90</sub> , Дж/м <sup>2</sup>	ЛД <sub>99,99</sub> , Дж/м <sup>2</sup>
Спорообразующие штаммы		
1т2	100	1200
1т3	170	1300
1т5	150	1200
6т2	80	1250
7т1	140	1500
7тк3	100	1100
Аспорогенные штаммы		
1т4	150	1400
6т1	70	400
<i>E. coli</i>	15	70

**Примечание.** Для сравнения приведены соответствующие данные для радиочувствительного штамма *E. coli* Bs-1.

Таблица 5

**Антагонистическая активность штаммов, изолированных из экосистем побережья Мертвого моря**

№ штаммов	Тест-культуры			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25592	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 р	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4141	<i>Candida albicans</i> УКМ У-690
Зона задержки роста тест-культур, мм				
1т2	0	28	0	30
1т3	0	26	0	25
1т5	0	27	0	24
6т2	0	0	0	0
7т1	0	0	0	0

**Примечание.** 0 – отсутствие зоны ингибирования

В целом, изучение экофизиологических особенностей бактерий, изолированных из прибрежных экосистем Мёртвого моря, а также их устойчивости к экстремальным факторам показало, что они являются умеренными галофилами, термотолерантны и резистентны к высоким дозам УФ излучения. Эти свойства, видимо, сформировались, как ответ на абиотические экстремальные факторы, характерные для данного региона.

**В.О. Романовська, Л.В. Авдеева, Г.В. Гладка, І.Р. Пritула, М.А. Хархота, О.Б. Таширев**

*Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ*

## **РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ЧИННИКІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ІЗ ЕКОСИСТЕМ УЗБЕРЕЖЖА МЕРТВОГО МОРЯ**

### **Резюме**

На мікроорганізми із екосистем узбережжя Мертвого моря діють такі екстремальні чинники, як УФ радіація, висока температура і солоність, а також малий вміст доступної води. Вивчена стійкість до цих чинників мікроорганізмів, виділених із екосистем цієї зони: (вертикальні обриви навколо Мертвого моря, глинисто-соляна рівнина і чорна високо мінералізована грязь). Із цих екосистем ізольовані аеробні, хемоорганотрофні, термотолерантні, помірно галофільні бактерії, які відповідно до їх морфолого-фізіологічних ознак подібні видам *Gracilibacillus halotolerans*, *Salimicrobium album* і роду *Caryophanon*. Всі ізоляти росли при 0-10 % NaCl в середовищі (один штам – при 15 % NaCl), в діапазоні 30-50 °С. Резистентність до УФ радіації виявлено у всіх досліджених бактерій. Летальні дози УФ (LD<sub>90</sub> і LD<sub>99,99</sub>) для спороутворюючих штамів роду *Gracilibacillus* складала, відповідно 100-170 і 1100-1500 Дж/м<sup>2</sup>; для штаму *Salimicrobium* 6т1 (не утворює спор) – 70 і 400 Дж/м<sup>2</sup>; для штаму який утворює трихоми 1т4 (рід *Caryophanon*) – 150 і 1400 Дж/м<sup>2</sup>. Декілька штамів роду *Gracilibacillus* виявляли сильну антагоністичну дію на умовно-патогенні тест-культури *Staphylococcus aureus* 209р і *Candida albicans* УКМ Y-690. Можна припустити, що стійкість мікроорганізмів із екосистем узбережжя Мертвого моря до екстремальних чинників сформувалася під впливом абіотичних (фізико-хімічних) чинників, типових для цього регіону.

Ключові слова: екстремофільні бактерії, Мертве море, екосистеми узбережжя, галотолерантність, термотолерантність, стійкість до УФ радіації, антагонізм.

**V.A. Romanovskaya, L.V. Avdeeva, G.V. Gladka, I.R. Pritula, M.A. Kharkhota, A.B. Tashyrev**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **RESISTANCE TO EXTREMAL FACTORS OF MICROORGANISMS OF COASTAL ECOSYSTEMS OF THE DEAD SEA**

### **S u m m a r y**

Such extreme factors as UV radiation, high temperature and salinity, and also the small amount of accessible water have an influence on microorganisms of coastal ecosystems of the Dead Sea. Resistance to these factors of the microorganisms isolated from ecosystems of this region (vertical steep gorge around the Dead Sea, clay-salt plain and black highly mineralized muds) is studied. Aerobic, chemoorganotrophic, thermotolerant, moderately halophilic bacteria which, according to their morphological and physiological properties, are similar to species *Gracilibacillus halotolerans*, *Salimicrobium album* and genus *Caryophanon* have been isolated from these ecosystems. All strains grew at 0-10 % of NaCl in the medium (one strain - at 15 % of NaCl), in the range of 30-50 °C. Resistance to UV radiation has been revealed in all the investigated bacteria. Lethal doses of UV (LD<sub>90</sub> and LD<sub>99,99</sub>) for spore-forming strains of genus *Gracilibacillus* were 100-170 and 1100-1500 J/m<sup>2</sup>, respectively; for strain *Salimicrobium* 6t1 (does not form spores) - 70 and 400 J/m<sup>2</sup>; for the strain 1t4 (genus *Caryophanon*), forming filamentous (or trychomes) – 150 and 1400 J/m<sup>2</sup>. Some strains of genus *Gracilibacillus* had strong antagonistic effect on conditionally pathogenic test cultures *Staphylococcus aureus* 209p and *Candida albicans* UCM Y-690. It is conceivable that resistance of microorganisms of coastal ecosystems of the Dead Sea to extreme factors was generated under the influence of abiotic (physical and chemical) factors typical of this region.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** extremophilic bacteria, the Dead Sea, coastal ecosystems, halotolerance, thermotolerance, resistance to UV radiation, antagonism.

**The authors' address:** Romanovskaya V.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Егорев Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1957. – 77 с.
2. Егорев Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 512 с.



3. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учеб. заведений / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
4. Arahal D.R., Márquez M.C., Volcani B.E., Schleifer K.H., Ventosa A. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – 49, N 2. – P. 521–530.
5. Chen Y.G., Cui X.L., Zhang Y.Q., Li W.J., Wang Y.X., Xu L.H., Peng Q., Wen M.L., Jiang C.L. *Gracilibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – 58, N 10. – P. 2403–2408.
6. Farrow J.A., Wallbanks S., Collins M.D. Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – 44, N 1. – P. 74–82.
7. Garabito M.J., Arahal D.R., Mellado E., Mdrquez M.C., Ventosa A. *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species // Ibid. – 1997. – 47, N 2. – P. 735–741.
8. Ghozlan H., Deif H., Kandil R.A., Sabry S. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2006. – 52, N 2. – P. 63–72.
9. Javor B. Dead Sea // Hypersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry. – Berlin: Springer, 1989. – P. 282–291.
10. Jung-Hoon Yoon, So-Jung Kang, Tae-Kwang Oh. Reclassification of *Marinococcus albus* Hao et al. 1985 as *Salimicrobium album* gen. nov., comb. nov. and *Bacillus halophilus* Ventosa et al. 1990 as *Salimicrobium halophilum* comb. nov., and description of *Salimicrobium luteum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – 57. – P. 2406–2411.
11. Li W.J., Schumann P., Zhang Y.Q., Chen G.Z., Tian X.P., Xu L.H., Stackebrandt E., Jiang C.L. *Marinococcus halotolerans* sp. nov., isolated from Qinghai, north-west China // Ibid. – 2005. – 55, N 5. – P. 1801–1804.
12. Oren A. The microbial ecology of the Dead Sea // Advances in Microbial Ecology / Ed by K. C. Marshall. – New York: Plenum, 1988. – Vol. 10. – P. 193–229.
13. Oren A. Ecology of extremely halophilic microorganisms // The Biology of Halophilic Bacteria / Ed by R.H. Vreeland & L.I. Hochstein. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1993. – P. 25–53.
14. Ventosa A., Márquez M.C., Garabito M.J., Arahal D.R. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments // Extremophiles. – 1998. – 2, N 3. – P. 297–304.
15. Ventosa A., Arahal D.R., Volcani B. E. Studies on the microbiota of the Dead Sea - 50 years later // Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments / Ed by A. Oren. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1999. – P. 139–147.
16. Wainø M., Tindall B.J., Schumann P., Ingvorsen K. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – 49, N 2. – P. 821–831.

Отримано 15.10.2012