

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ СУДИННИХ РОСЛИН АНТАРКТИКИ

Юнгін О.С.¹, Прекрасна Є.П.², Ластовецька Л.О.¹, Маслак В.І.¹, Кудіна С.В.¹

¹Київський національний університет технологій та дизайну
вул. Немировича-Данченка, 2, 01001, м. Київ

²Державна установа «Національний науковий антарктичний центр»
бульв. Тараса Шевченка, 16, 01601, м. Київ
olgaungin@gmail.com, preckrasna@gmail.com

Успішна колонізація земель Антарктики судинними рослинами *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, їх адаптація до стресових умов регіону пов'язана не лише з кліматичними змінами, а й із функціонуванням мікробних угруповань філо- й ендосфери вказаних рослин. Одним із вагомих факторів ефективності колонізації рослини бактеріями є їх здатність утворювати біоплівки на зовнішніх і внутрішніх поверхнях рослин. Внесок мікробіоти з ендосфери (внутрішні тканини рослин) та філосфери (надземної частини листя рослин) у витривалість рослин в умовах Антарктичного півострова та особливостей формування їх біоплівок залишається невивченим. Метою роботи було дослідження фізіолого-біохімічних особливостей і біоплівкоутворення бактерій, асоційованих із судинними рослинами Антарктики *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*. У результаті роботи показана гетеротрофність досліджуваних бактеріальних ізолятів та наявність у них широкого спектра сахаролітичних ферментів для утилізації моно- й дисахаридів. Крім того, виявлена здатність культур використовувати молекулярний азот атмосфери як єдине джерело нітрогену, що також є ознакою ріст-стимулювальних властивостей бактерій. Показана здатність культур формувати різні типи біоплівок та їх широкий температурний діапазон культивування. Гетеротрофність бактеріальних ізолятів, виділених із біомаси *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, наявність у досліджуваних культур широкого спектра сахаролітичних ферментів для утилізації моно- й дисахаридів, а також їх здатність фіксувати атмосферний азот свідчать на користь їх участі в рослинно-мікробних взаємодіях і потенціальному стимулюванні росту та розвитку судинних рослин Антарктики. Широкий температурний діапазон досліджуваних культур і їх оптимум культивування може свідчити про оригінальність їх походження та наявність проміжного хазяїна (ссавця та/або птаха) у контексті екосистеми антарктичного півострова. **Ключові слова:** біоплівки, бактерії філосфери, судинні рослини Антарктики.

Research of physiological and biochemical characteristics and biofilm formation of bacteria isolated from vascular plants of Antarctica. Yunhin O., Prekrasna Ye., Lastovetska L., Maslak V., Kudina S.

Successful colonization of Antarctic lands by vascular plants *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* and their adaptation to the stressful environments of the region is associated not only with climate change but also with the functioning of microbial groups of phylo- and endosphere of these plants. One of the important factors in the effectiveness of bacterial plant colonization is their ability to form biofilms on the outer and inner parts of plants. The contribution of plant-associated microbiota to plants development and its biofilm formation aspects remains unexplored. The aim of the research was to study physiological and biochemical characteristics and biofilm formation of bacteria associated with vascular plants of Antarctica *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. As a result the heterotrophic metabolism of the studied bacteria and a wide range of saccharolytic enzymes for the utilization of mono- and disaccharides were shown. Moreover, the use of atmospheric nitrogen as the sole source of nitrogen for studied bacteria was observed. That was also a sign of the plant growth-stimulating properties of bacteria. The ability of bacteria to form different types of biofilms and their wide temperature cultivation range was shown. Heterotrophic metabolism bacterial isolates from the biomass of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*, the wide range of saccharolytic enzymes for utilization of mono- and disaccharides, as well as their ability to use atmospheric nitrogen indicate their potential promoting of vascular plants in Antarctica. The wide cultivation range of the studied bacteria and their optimum of cultivation may indicate their origin and the fact of an intermediate host (mammal and/or bird) existence in the context of the Antarctic peninsula ecosystem. **Key words:** biofilms, bacteria of phylosphere, vascular plants of Antarctica.

Постановка проблеми. Мікроорганізми, асоційовані з антарктичними рослинами *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, задіяні в каскаді біохімічних реакцій, що допомагають рослинам виживати й повноцінно функціонувати в екстремальних ґрунтово-кліматичних умовах Антарктики. Здатність мікроорганізмів ендосфери вказаних рослин утилізувати широкий спектр джерел карбону за низьких температур, формувати біоплівки та брати участь у трансформації головних біогенних

елементів відіграє важливу роль в адаптації рослин до стресових факторів регіону.

Тож **метою роботи** було дослідження фізіолого-біохімічних особливостей та біоплівкоутворення бактерій, асоційованих із судинними рослинами Антарктики *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*.

Актуальність дослідження. Зміни клімату, що безпосередньо впливають на Антарктичний півострів, сприяють успішній колонізації вільних від льоду земель двома антарктичними судинними

рослинами – *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*. Відомо, що бактерії мають ключове значення для росту й адаптації рослин до екстремальних умов росту та розвитку. Одним із вагомих факторів ефективності колонізації рослини бактеріями є їх здатність утворювати біоплівки на зовнішніх і внутрішніх поверхнях рослини. Внесок мікробіоти з ендосфери (внутрішніх тканин рослин) та філосфери (надземної частини листя рослин) у витривалість рослин в умовах Антарктичного півострова та особливостей формування їх біоплівок залишається невивченим. З огляду на кліматичні зміни, що проявляються в Антарктичному півострові [1], актуальним завданням є дослідження мікроорганізмів, асоційованих із судинними рослинами цього регіону.

Зв'язок авторського доробку з важливими науковими та практичними завданнями. Робота проводилася в межах завдання 13 «Вивчення походження, біорізноманіття та проведення моніторингу наземних екосистем Антарктики в умовах кліматичних змін» Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці на 2011–2023 рр., затвердженої постановою Кабінету Міністрів України від 3 листопада 2010 р. № 1002 (у редакції постанови Кабінету Міністрів України від 20 січня 2021 р. № 32).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Біоплівкова форма росту є природною стратегією існування мікроорганізмів у навколишньому середовищі. У контексті рослинно-мікробних взаємодій рослина є не лише організмом-господарем, а й поверхнею для росту та розвитку біоплівок бактерій-ендофітів [2].

Дослідження в Антарктиді, як правило, зосереджені на різноманітті макроорганізмів та генезисі, властивостях і класифікації ґрунтів. У плані мікробіології найновіші дослідження зосереджувалися на оцінці біотехнологічного потенціалу вторинних метаболітів (антибіотиків, протипухлинних засобів, ферментів тощо), що виробляються культивованими бактеріями (зокрема, актинобактеріями). Мало дослідників вивчали мікробне різноманіття та перспективні рослинно-бактеріальні взаємодії. Застосування молекулярних підходів на основі гена 16S рибосомної РНК (рРНК) виявило схожі закономірності бактеріального різноманіття між двома судинними видами рослин (*Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*), знайденими в антарктичних екосистемах [3]. Відомо, що мікроорганізми беруть участь у метаболізмі зазначених видів рослин та забезпечують їх функціонування в суворих умовах регіону. Так, нещодавно був опублікований геном бактерії, виділеної з філосфери *Deschampsia antarctica*, що має антифризні білки та відповідає за інгібування рекристалізації льоду в рослинах за низьких температур [4].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття. Великий науковий інтерес до мікроорганізмів, асоційованих із судинними рослинами антарктичного

регіону, що спостерігається в дослідженнях останніх років, зумовлений не лише поглибленням теоретичних відомостей про рослинно-мікробні взаємодії, а й перспективами зміни клімату у світі та біотехнологічним потенціалом вказаних мікроорганізмів. Антарктичні рослини розробили механізми адаптації, які дають їм змогу успішно переживати екстремальні умови регіону. Деякі ефективні механізми протидії несприятливим стресовим факторам виникають унаслідок встановлення функціонального симбіозу з ендофітними мікроорганізмами. Зокрема, велику увагу було приділено вивченню впливу мікрومیцетів-ендофітів. Так, дослідження останніх років показали провідну роль мікрومیцетів-ендофітів у підвищенні толерантності рослин до ультрафіолетового випромінювання (УФ-В) та мінімізації пошкодження клітин рослин [5]; стимуляції росту рослин за рахунок підвищення мінералізації нітрогену [6]; покращення фізіологічних показників за сольового стресу за рахунок продукування енергії та комплексноутворення з Na^+ [7].

Проте майже немає досліджень щодо розвитку та впливу бактеріальних ендофітів судинних рослин антарктичного регіону. У роботі [8] досліджено розмаїття мікробних угруповань ризо-, філо- та ендосфери *D. antarctica* та *C. quitensis*. Більшість мікроорганізмів належить до груп *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* та *Actinobacteria* та є специфічними для різних частин рослин. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу й статистичних обробок даних встановлено, що виявлені бактерії відіграють роль у гетеротрофії, ферментації та відновленні нітратів. Однак потрібні додаткові дослідження для з'ясування ролі мікроорганізмів в успішній колонізації антарктичними рослинами вільних від льоду земель Антарктики. Бактерії, що живуть у холодному природному середовищі (наприклад, в Антарктиді), реалізують стратегію біоплівкового росту, хоча механізми того, як цей спосіб життя пов'язаний із їх адаптацією до навколишнього середовища в контексті бактеріально-рослинних взаємодій, були не досить досліджені.

Новизна. Уперше оцінено здатність бактеріальних ізолятів, асоційованих із *D. antarctica* та *C. quitensis*, формувати біоплівки за широкого температурного діапазону, визначено оптимум їх культивування. Уперше показано їх здатність використовувати атмосферний азот як єдине джерело нітрогену та наявність сахаролітичних ферментів.

Методологічне та загальнонаукове значення. У роботі досліджували 12 культур, що виділені з *D. antarctica* та *C. quitensis*, які були відібрані під час 25-ї Української антарктичної експедиції (січень – квітень 2020 р.) вздовж Західної частини Антарктичного півострова.

В основі роботи лежить комплексний підхід до вивчення здатності мікроорганізмів формувати біоплівки. У його межах були застосовані класичні фізіолого-біохімічний і мікробіологічний підходи, які доцільно використовувати для характеристики нових

штамів. Так, культури вирощували на мінімальних середовищах із додаванням різних джерел карбону (ряди Гіса) для виявлення цукролітичних особливостей мікроорганізмів [9]. Здатність мікроорганізмів використовувати молекулярний азот атмосфери як єдине джерело нітрогену оцінена з використанням середовища Ешбі [10]. Наявність бактеріального росту фіксували за зміною оптичної густини середовища та оцінювали як + (слабкий ріст), ++ (помірний ріст), +++ (рясний ріст).

Під час вивчення здатності виділених культур бактерій формувати біоплівки частково застосований метод комбінованого дослідження біоплівок [11]. Для отримання біоплівок культури вирощували у статичних закритих мікрокосмах (віалах) із середовищем Nutrient Broth (HiMedia, Ltd.) за температури 4, 22, 37 та 42°C протягом 3 діб. Такі температурні режими перекривають можливі варіанти існування бактерій не лише в навколишньому середовищі, а й за умов наявності проміжного хазяїна (савця чи птаха). Досліджуваними параметрами були приріст біомаси (продуктивність) і ступінь прикріплення клітин до поверхні, що визначали спектрофотометрично за довжини хвиль 600–620 та 570 нм відповідно. Для визначення прикріплення клітин до поверхні використано метод культивування ізолятів у культивальних 96-лункових планшетах із подальшим фарбуванням кристалічним фіолетовим [12].

Виклад основного матеріалу. У результаті роботи показана гетеротрофність бактеріальних ізолятів, виділених із біомаси *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, та наявність у досліджуваних культур широкого спектра сахаролітичних ферментів для утилізації моно- й дицукрів (див. табл. 1). Серед запропонованих моноцукрів представлені як гексози, так і пентози; як дицукри представлені лактоза й цукроза. Позначення «+» відображає позитивну реакцію, «+-» – невиражену позитивну реакцію, «-» – негативну реакцію.

Таблиця 1

Здатність утилізувати цукри як єдине джерело карбону

Ізолят	Гексози					Пентози		Дицукри	
	<i>Glu</i>	<i>Fru</i>	<i>Man</i>	<i>Gal</i>	<i>Ara</i>	<i>Xyl</i>	<i>Ryb</i>	<i>Lac</i>	<i>Suc</i>
9.1	+	-	+	-	-	-	-	-	-
10.1	+	-	+	+	-	+	+	-	-
10.4	+	-	+	+	-	+	+	-	-
15.6	+	-	-	-	-	+	-	-	-
16.7	+	-	-	-	+	+	-	+	+
23.2	+	+	+	-	+	+	-	+	+
25.2	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26.2	+	-	+	+	-	+	-	-	+-
26.4	+	-	+	+	-	+	-	-	+
26.7	+	+	+	-	-	-	+	+-	+
39.12	+	+	-	-	-	-	+	-	-
40.1	+	+	+	+	+	+	+	+-	+

Найбільше ізолятів утилізували глюкозу, манозу та ксилозу. Маноза є ізомером глюкози, компонентом багатьох полісахаридів та змішаних біополімерів рослинного, тваринного й бактеріального походження. Як основна складова частина полімерів ксилану в рослинах ксилоза вважається одним із найпоширеніших вуглеводів на Землі після глюкози. З огляду на те, що досліджувані ізоляти асоційовані з рослинами, цілком зрозуміло, що саме вказані цукри можуть бути перспективними для метаболічного використання бактеріями.

Цікаво, що ізоляти 25.2 та 40.1 утилізували найбільшу кількість із представлених цукрів – 8 із 9. Найменшу кількість цукрів утилізував ізолят 9.1 – 2 з 9 (глюкозу та манозу).

Здатність мікроорганізмів використовувати молекулярний азот атмосфери як єдине джерело нітрогену було виявлено в таких культур: 10.1 (+), 10.4 (+), 25.2 (+), 26.2 (+), 26.7 (+++), 40.1 (+++). Найбільший приріст біомаси спостерігали в культурі 26.7 та 40.1.

Досліджено здатність ізолятів формувати біоплівки за широкого діапазону температур [13]. Також визначали тип біоплівки, що формувалася ізолятами на розділі фаз: ALS – біоплівка на розділі фаз «повітря – рідина – тверда поверхня» (air – liquid – solid), LS – біоплівка на розділі фаз «рідина – тверда поверхня» (liquid – solid) [14] (див. табл. 2).

Таблиця 2

Здатність ізолятів формувати біоплівки за різних температур культивування

Ізолят	Ріст за температури культивування				Тип біоплівки на розділі фаз
	4°C	26°C	37°C	42°C	
9.1	-	+	+	+	ALS*
10.1	-	+	+	+	ALS
10.4	+	+	+	-	LS**
15.6	-	+	-	-	LS
16.7	-	+	-	-	LS
23.2	-	+	-	-	LS
25.2	+	+	+	-	ALS
26.2	+	+	+	+	ALS
26.4	+	+	+	+	LS
26.7	+	+	+	+	ALS
39.12	+	+	+	+	LS
40.1	-	+	+	+	LS

Встановлено, що досліджувані ізоляти мають різний температурний діапазон культивування, що може свідчити про оригінальність їх походження та наявність проміжного хазяїна (наприклад, савці та/або птахи). Формування LS біоплівок є важливою ознакою бактерій, асоційованих із судинними рослинами. З огляду на функціонування всередині рослини мікроорганізми мають колонізувати тканини рослин у мікроаерофільних умовах.

Цікавим є розподіл продуктивності культур за різних температурних діапазонів. Так,

ізоляти 9.1, 10.1 та 40.1 ростуть у діапазоні 26–42°C, а 10.4 та 25.2 – за діапазону 4–37°C. Ізоляти 26.2, 26.4, 26.7 та 39.12 мали найширший температурний діапазон культивування з-поміж усіх досліджуваних культур – 4–42°C. Крім того, три культури з усіх досліджуваних – 15.6, 16.7 та 23.2 – формували LS біоплівку та продукували біомасу лише за температури 26°C. Це, імовірно, може бути пов'язано з функціонуванням цих бактерій як внутрішніх асоціантів судинних рослин.

Головні висновки. Гетеротрофність бактеріальних ізолятів, виділених із біомаси *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, наявність у досліджуваних культур широкого спектра сахаролітичних ферментів для утилізації моно- й дисукрів, а також їх здатність фіксувати атмосферний азот свідчить про їх участь у рослинно-мікробних взаємодіях та потенціальному стимулюванні росту й розвитку

судинних рослин Антарктики. Широкий температурний діапазон досліджуваних культур і їх оптимум культивування може свідчити про оригінальність їх походження та наявність проміжного хазяїна (савця та/або птаха) у контексті екосистеми антарктичного півострова.

Перспективи використання результатів дослідження. Дослідження рослинно-мікробних взаємодій антарктичного регіону загалом та мікроорганізмів Антарктики зокрема є важливим не лише для України, а й для світової науки. Антарктичний регіон вважається одним із найбільш перспективних із позиції виділення мікроорганізмів із біотехнологічним потенціалом. Результати дослідження допомагають охарактеризувати бактеріальні ізоляти, асоційовані із судинними рослинами Антарктики, та розширити уявлення про їх роль у контексті рослинно-мікробних взаємодій.

Література

1. *In situ* warming in the Antarctic: effects on growth and photosynthesis in Antarctic vascular plants / P.L. Sáez, L.A. Cavieres, J. Galmés, E. Gil-Pelegrín, J.J. Peguero-Pina, D. Sancho-Knapik, L.J. Corcuera. *New Phytologist*. 2018. Vol. 218. Iss. 4. P. 1406–1418.
2. Moshynets O.V. Viewing biofilms within the larger context of bacterial aggregations. *Biofilms* : book / O.V. Moshynets, A.J. Spiers. Rijeka, Croatia : InTech Press, 2016. P. 3–22.
3. Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments / M.A. Jorquera, F. Maruyama, A.V. Ogram, O.U. Navarrete, L.M. Lagos, N.G. Inostroza, M. de La Luz Mora. *Microbial ecology*. 2016. Vol. 72. Iss. 3. P. 633–646.
4. Draft genome sequences of bacteria isolated from the *Deschampsia antarctica* phyllosphere / F.P. Cid, F. Maruyama, K. Murase, S.P. Graether, G. Larama, L.A. Bravo, M.A. Jorquera. *Extremophiles*. 2018. Vol. 22. Iss. 3. P. 537–552.
5. Fungal endophytes enhance the photoprotective mechanisms and photochemical efficiency in the Antarctic *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. exposed to UV-B radiation / A. Barrera, R. Hereme, S. Ruiz-Lara, L.F. Larrondo, P.E. Gundel, S. Pollmann, P. Ramos. *Frontiers in Ecology*. 2020. № 8. P. 122.
6. Root endophytic *Penicillium* promotes growth of Antarctic vascular plants by enhancing nitrogen mineralization / R. Oses-Pedraza, C. Torres-Díaz, P. Lavín, P. Retamales-Molina, C. Atala, J. Gallardo-Cerda, M.A. Molina-Montenegro. *Extremophiles*. 2020. Vol. 24. Iss. 5. P. 721–732.
7. Molina-Montenegro M.A., Acuña-Rodríguez I.S., Torres-Díaz C. Antarctic root endophytes improve physiological performance and yield in crops under salt stress by enhanced energy production and Na⁺ sequestration. *Sci Rep*. 2020. № 10. P. 5819.
8. Niche differentiation in the composition, predicted function, and co-occurrence networks in bacterial communities associated with Antarctic vascular plants / Q. Zhang, J.J. Acuña, N.G. Inostroza, P. Duran, M.L. Mora, M.J. Sadowsky, M.A. Jorquera. *Frontiers in microbiology*. 2020. № 11. P. 1036.
9. Сульдина Е.В., Феоктистова Н.А., Богданов И.И. Выделение новых штаммов бактерий *Bacillus megaterium* и изучение их биологических свойств. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020. № 3. С. 60–67.
10. Yanfang N., Wei Y., Lihong C. Diversity and Characterization of Nitrogen-fixing Bacteria in *Betula platyphylla* Rhizosphere in Arxan. *Journal of Northeast Forestry University*. 2017. P. 05.
11. Adaptive radiation of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in experimental microcosms provides an understanding of the evolutionary ecology and molecular biology of AL interface biofilm formation / A. Koza, A. Kuśmierska, K. McLaughlin, O. Moshynets, A.J. Spiers. *FEMS Microbiology Letters*. 2017. Vol. 364. Iss. 12.
12. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification / Z. Xu, Y. Liang, S. Lin, D. Chen, B. Li, L. Li, Y. Deng. *Current microbiology*. 2016. Vol. 73. Iss. 4. P. 474–482.
13. Skogman M.E., Vuorela P.M., Fallarero A. Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Journal of antibiotics*. 2012. Vol. 65. Iss. 9. P. 453–459.
14. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* at the air-liquid interface in aquatic environments / J.A. Medrano-Félix, C. Chaidez, K.D. Mena, M. del Socorro Soto-Galindo, N. Castro-del Campo. *Environmental monitoring and assessment*. 2018. Vol. 190. Iss. 4. P. 1–9.