

УСТОЙЧИВОСТЬ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ КАРСТОВЫХ ПОЛОСТЕЙ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ

А. Б. Таширев¹
О. С. Сулова¹
П. В. Рокитко¹
А. А. Олексенко²
К. М. Бондарь³

¹Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

²Национальный университет «Киево-Могилянская академия»,
Украина

³Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: olga.suslova11@gmail.com

Получено 22.07.2014

Целью работы было установление количественных показателей устойчивости исследованных бактерий к экстремальным факторам — токсичным металлам (Cu^{2+}), органическим ксенобиотикам (*n*-нитрохлорбензол) и УФ-облучению. Протестированы шесть штаммов азотфиксирующих бактерий, выделенных из образцов глин двух карстовых полостей — Мушкарова Яма (Подолье, Украина) и Куйбышевская (Западный Кавказ, Абхазия), а также референтный штамм *Azotobacter vinelandii* УКМ В-6017. Для этого определяли максимально допустимые концентрации Cu^{2+} и *n*-нитрохлорбензола в концентрационном градиенте и летальные дозы УФ по кривым выживаемости. Максимально допустимые концентрации для штаммов: 10 мг/л Cu^{2+} , 70–120 мг/л *n*-нитрохлорбензола. Максимальные дозы УФ варьируют в диапазоне 55–85 Дж/м² (ЛД_{99,99}). Установлено, что по показателям устойчивости к трем классам экстремальных факторов выделенные штаммы карстовых полостей схожи со штаммом наземных почвенных экосистем. Наиболее активные исследуемые штаммы снижают концентрацию *n*-нитрохлорбензола в среде в 13 раз. Явление деструкции *n*-нитрохлорбензола азотфиксирующими бактериями может быть использовано для создания новых природоохранных биотехнологий для очистки промышленных сточных вод от нитрохлорароматических ксенобиотиков. Выделенные штаммы могут быть применены в качестве деструкторов ксенобиотиков для биоремедиации почв в агробиотехнологиях, а также для оптимизации азотного питания растений наземных экосистем.

Ключевые слова: карстовые полости, азотфиксирующие бактерии, природоохранные биотехнологии.

Карстовые полости характеризуются полным отсутствием света и стабильностью физико-химических условий на протяжении сотен лет (постоянная температура, высокая влажность, низкая концентрация органических соединений). Эти экосистемы изолированы от таких экстремальных факторов, как электромагнитное излучение (УФ, γ -радиация), а также неорганических и органических ксенобиотиков, которые адсорбируются на входе в карстовые полости мощными отложениями глин [1].

Еще в 2001 г. Northup показал, что в глинах карстовых полостей присутствуют группы микроорганизмов цикла азота [2]. Особый интерес представляют азотфиксирующие бактерии. Они трансформируют молекулярный азот в органический и способствуют его накоплению в глинах карстовых полостей.

Таким образом, азотфиксирующие бактерии подготавливают условия для последующего заселения глин карстовых полостей микробными сообществами.

Известно, что аэробные азотфиксирующие бактерии по сравнению с другими группами цикла азота являются самыми уязвимыми к действию экстремальных факторов — токсичных металлов, органических ксенобиотиков, УФ-излучения. Поскольку азотфиксирующие микроорганизмы являются «пионерами» заселения экстремальных систем, необходимо определить количественные параметры гомеостаза (способность сохранять стабильность функционирования при воздействии экстремальных факторов) этих микроорганизмов в условиях экстремальных факторов, т. е. способность расти и функционировать при

воздействии этих факторов. Целью работы было определение количественных показателей устойчивости штаммов азотфиксирующих бактерий, выделенных из глини карстовых полостей Мушкарова Яма и Куйбышевская, к трем классам экстремальных факторов — электромагнитному излучению (УФ), неорганическим (токсичный металл Cu^{2+}) и органическим ксенобиотикам (*n*-нитрохлорбензол — НХБ).

Материалы и методы

Объектами исследования были изолированные из образцов глины карстовых полостей шесть штаммов азотфиксирующих бактерий. Один образец глины был отобран в максимально удаленной от входа точке лабиринтовой пещеры Мушкарова Яма, расположенной в гипсах неогенового возраста на Подолье Украины. Другой — в донном зале вертикальной полости Куйбышевская, образованной в юрских известняках Западного Кавказа (Абхазия), на глубине 1 км от входа. После отбора образцы хранили в холодильнике при 4 °С в герметично закрытых полиэтиленовых пакетах. Для последующего учета количества клеток в 1 г абсолютно сухой глины определяли коэффициент влажности глины. Референтным штаммом служил *Azotobacter vinelandii* УКМ В-6017.

Азотфиксирующие бактерии выделяли на жидкой и агаризованной среде Эшби [3]. Состав среды, г/л: K_2HPO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,2; NaCl — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; CaCO_3 — 5,0; раствор микроэлементов по Федорову — 1 мл; pH среды — 7,2–7,4. Источник углерода (сахароза) вносили как в «копикоцентрации» — 20 г/л (8,4 г С/л), так и в «олигоконцентрации» — 0,02 г/л (0,084 г С/л). По данным литературы, при копиокарботрофных условиях концентрация углерода в среде составляет не менее 0,5 г/л, а при олигокарботрофных — не более 0,09 г/л [4]. Для приготовления среды использовали стерильную водопроводную воду, которую предварительно кипятили (15 мин), охлаждали и фильтровали через ватный фильтр.

Для доказательства принадлежности выделенных штаммов к азотфиксирующим бактериям их трижды последовательно пересевали в жидкую среду Эшби (единственный источник азота — атмосферный азот). Колонии, выросшие после третьего посева, рассевали на агаризованную среду для проверки чистоты культуры с получением единичных колоний.

Способность штаммов фиксировать молекулярный азот определяли высевом культур в жидкую среду (100 мл) во флаконы (500 мл) с герметичным затвором. В закрытых инокулированных флаконах создавали избыточное давление воздуха во избежание разрядки атмосферы при потреблении кислорода штаммами. Избыточное давление создавали, вводя шприцем стерильный воздух (100 мл). Далее культуры выращивали на качалке (145 об/мин, 7 сут) и ежедневно определяли количественный состав газовой фазы (O_2 , N_2 , CO_2) по стандартной методике по теплопроводности катарометра на газовом хроматографе ЛХМ-8-МД [3]. Использовали две стальные колонки — одна (I) для анализа H_2 , O_2 , N_2 и CH_4 , другая (II) — для CO_2 . Параметры колонок: I — $l = 3$ м, $d = 3$ мм, сорбент 13X (NaX); II — $l = 2$ м, $d = 3$ мм, сорбент Porapak-Q. Температура колонок — 60 °С, испарителя — 75 °С, детектора — 60 °С; ток детектора — 50 мА. Газ-носитель — аргон; скорость подачи газа — 30 мл/мин. Содержание газов O_2 , N_2 и CO_2 (%) рассчитывали по площади их пиков, которые регистрировались самописцем полярографа.

Устойчивость к Cu^{2+} определяли на агаризованной среде Эшби в концентрационном диапазоне 10–50 мг/л Cu^{2+} с шагом 10 мг/л. Для этого в расплавленную и охлажденную до 50 °С среду вносили соответствующую аликвоту раствора хлорида Cu^{2+} (исходная концентрация 20 г/л Cu^{2+}). Среду с медью разливали в чашки Петри и выдерживали 2 сут при 22 °С для проверки стерильности. В качестве контроля роста штаммов использовали среду без Cu^{2+} .

Устойчивость к НХБ. В расплавленную и охлажденную до 50 °С агаризованную среду вносили спиртовой раствор НХБ (исходная концентрация 10 мг/мл) для получения концентрационного ряда 25–100 мг/л НХБ с шагом 25 мг/л. Среду с НХБ разливали в чашки Петри и выдерживали 2 сут для проверки стерильности.

Биомассу штаммов, выросших на агаризованной среде, суспендировали в стерильном физиологическом растворе до появления слабоопалесцирующей суспензии. Затем из этой суспензии в подготовленные чашки высевали штрихом микробные суспензии культур. Рост по штриху в присутствии Cu^{2+} или НХБ свидетельствовал об устойчивости культур к данным концентрациям ксенобиотика.

Устойчивость к УФ-облучению определяли по способности штаммов к росту после облучения (дальний ультрафиолет, $\lambda = 100$ –

280 нм). Для этого последовательные десятикратные разведения микробных суспензий ($0,1$ мл, 10^{-2} – 10^{-8}) высевали на предварительно подсушенную поверхность среды и облучали дозами УФ в диапазоне 20 – 200 Дж/м². Облученные чашки и контрольные (без облучения) культивировали при 25 °С в течение 3 – 6 сут в зависимости от длительности лаг-фазы роста штамма. Устойчивость азотфиксирующих бактерий к облучению оценивали по процентному содержанию выживших после указанных доз клеток. На дозовых кривых выживания, представляющих собой зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычисляли LD_{90} и $LD_{99,99}$ — дозы УФ, при которых погибает 90% и $99,99\%$ клеток, соответственно.

Все исследования проводили в трехкратной повторяемости. Статистический анализ экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Excel, уровень достоверности $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В глинах исследуемых карстовых полостей на протяжении сотен лет сохраняются полностью афотические условия. Также эти экосистемы не загрязнены токсичными металлами. Например, концентрация Cu^{2+} — не выше $0,25$ мг/м³ глины [1].

Из образцов глин горизонтальной (Мушкаророва Яма) и вертикальной (Куйбышевская) карстовых полостей выделены шесть штаммов азотфиксирующих бактерий. Штаммы образуют непигментированные или слабо пигментированные круглые колонии; подавляющее большинство — слизистые, выпуклые, блестящие. Морфология клеток большинства изолятов — палочки, некоторые образуют слизистые капсулы. Один изолят (N6) — диплококки (табл. 1).

Все исследуемые штаммы чувствительны к УФ-излучению, что согласуется с данными литературы [5]. Показатель LD_{90} варьировал в диапазоне 20 – 35 Дж/м², а $LD_{99,99}$ — 55 – 85 Дж/м² (рис. 1; табл. 2).

Таблица 1. Морфологическая характеристика штаммов азотфиксирующих бактерий карстовых полостей

Штамм	Морфология колоний	Условия	Морфология клеток
N1	Круглые, $d^1 = 0,01$ – $1,5$ мм, край тонкий неровный широкий полупрозрачный белый, центр плотный непрозрачный розовато-беловатый; плоские, сухие, вырастают в агар	Копикоарботрофные	Г+ палочки $0,65 \times 1,45$ мкм, слегка изогнутые, располагаются одиночно, иногда в коротких цепочках
N2	Круглые, $d = 0,2$ – 2 мм, край ровный; полупрозрачные, бесцветные, слизистые	Олигокарботрофные	Г+ палочки $0,9 \times 1,7$ мкм, в больших слизистых капсулах
N6	Круглые, слегка растекающиеся, $d = 0,5$ – 3 мм, край четкий, ровный; слизистые, полупрозрачные, слегка выпуклые	Копико-, олигокарботрофные	Г+ кокки, одиночные и диплококки
N7	Круглые, $d = 2$ – 4 мм, край ровный, серо-белые, непрозрачные, блестящие, выпуклые; старые колонии слегка розоватые	Копико-, олигокарботрофные	Г+ короткие палочки $0,9 \times 1,7$ мкм, с закругленными концами
N8	Круглые, $d = 1$ – 4 мм, край ровный; бледно-белые, полупрозрачные, сильновыпуклые, блестящие	Копико-, олигокарботрофные	Г+ палочки $1,02 \times 1,85$ мкм, слегка изогнутые
N10	Круглые, $d = 1,5$ – $4,0$ мм, край ровный; прозрачные, блестящие, сильновыпуклые	Копико-, олигокарботрофные	Г+ короткие палочки $0,8 \times 1,65$ мкм в слизистых капсулах

Примечания: ¹d — диаметр колоний; ² — данные атомно-адсорбционного анализа глин карстовых полостей, проведенного в Институте общей и неорганической химии НАН Украины.

Таблица 2. Устойчивость штаммов азотфиксирующих бактерий карстовых полостей к ксенобиотикам

Штамм	УФ, (ЛД ₉₀), Дж/м ²	УФ, (ЛД _{99,99}), Дж/м ²	ПДК Cu ²⁺ , мг/л	ПДК* НХБ, мг/л	
				копиокарботрофные условия	олигокарботрофные условия
N1	20±3****	70±2	< 10***	100	100
N2	30±3	70±2	< 10	70	100
N6	35±5	85±5	< 10	100	120
N7	32±2	78±2	< 10	100	100
N8	20±3	65±2	< 10	100	100
N10	20±2	55±2	10	100	90
56**	10±2	60±2	< 10	100	100

Примечания: * — на агаризованной среде Эшби с сахарозой;
 ** — референтный штамм *Azotobacter vinelandii* УКМ В-6017;
 *** — при 10 мг/л Cu²⁺ рост отсутствовал;
 ПДК — предельно допустимая концентрация;
 **** — $P \leq 0,05$ (для ЛД₉₀ и ЛД_{99,99}).

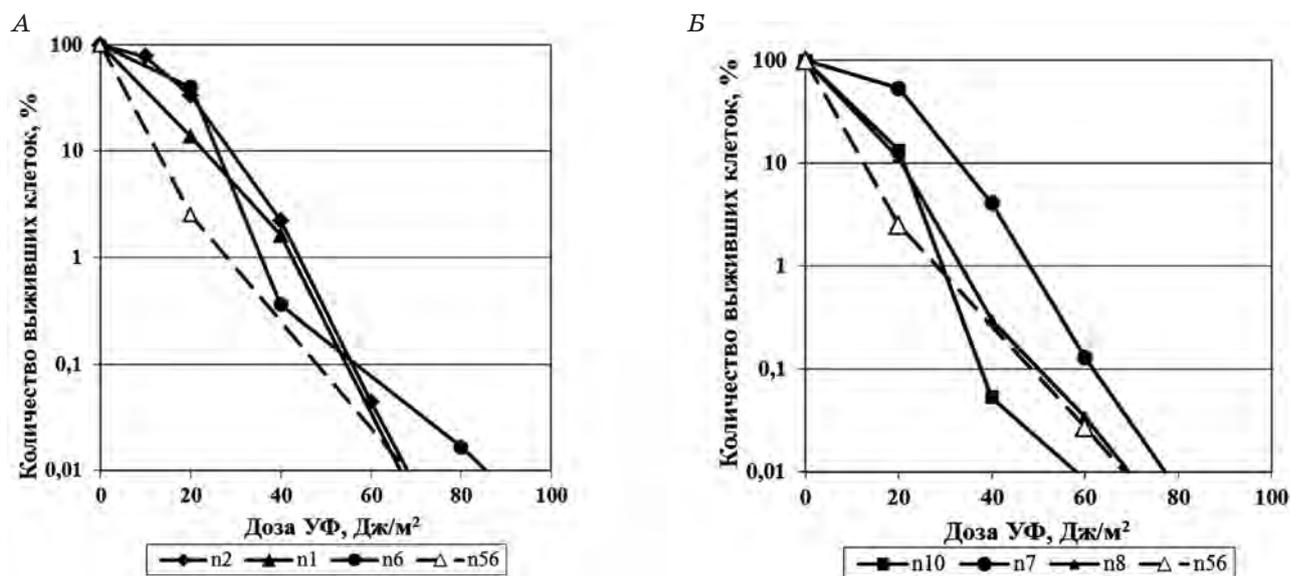


Рис. 1. Влияние доз УФ-облучения на штаммы азотфиксирующих бактерий:
 А — Мушкарова Яма, Б — Куйбышевская

Количественные параметры устойчивости (ЛД₉₀ и ЛД_{99,99}) исследуемых штаммов к УФ представлены на дозовых кривых (рис. 1).

По количественным показателям устойчивости к трем классам экстремальных факторов исследуемые штаммы карстовых полостей схожи с референтным штаммом *Azotobacter vinelandii* УКМ В-6017. Уровень устойчивости азотфиксирующих бактерий наземных экосистем и глин карстовых

полостей практически идентичен. Так, все исследуемые штаммы неустойчивы к воздействию Cu²⁺. Только для штамма N10 максимально допустимая концентрация Cu²⁺ составляла 10 мг/л. Такие результаты согласуются с данными литературы о высокой чувствительности азотфиксирующих бактерий к воздействию токсичных металлов [6]. Медь относится к металлам «комбинированного» действия, сочетая в себе одновременное негативное действие метал-

лов-окислителей и металлов-заместителей. Токсичность Cu^{2+} как окислителя связана с его высоким редокс-потенциалом [7]. Катион Cu^{2+} также способен к замещению металлов в активных центрах энзимов энергетического метаболизма, что приводит к их инактивации и гибели микроорганизмов [8].

Штаммы оказались устойчивы к *n*-нитрохлорбензолу (табл. 2). Он представляет собой персистентный синтетический нитрохлорароматический ксенобиотик. Его токсичность определяют ароматическое кольцо и присоединенные к нему нитрогруппа и хлор в пароположении. Бактерицидная концентрация для большинства почвенных и водных хемоорганотрофных микроорганизмов — 10 мг/л [9]. Максимально допустимая концентрация НХБ для исследуемых штаммов колебалась в пределах 70–120 мг/л. Рост штаммов в концентрационном градиенте НХБ на агаризованной среде отмечали как в копиокарботрофных, так и в олигокарботрофных условиях. Концентрация органических соединений в среде существенно не влияла на устойчивость штаммов к НХБ (табл. 2). Предельно допустимая концентрация для штаммов N1, N7, N8 составляла 100 мг/л как в копио-, так и в олигокарботрофных условиях.

Ранее были получены данные по устойчивости микроорганизмов наземных экосистем (антарктические клифы, почвы пустыни Негев, черноземы заповедника Аскания-Нова, почвы вокруг Мертвого моря и т. д.) к экстремальным факторам. Было показано существование двух типов ответов на данное воздействие [2, 3]. Ответ первого типа, так называемый «коррелятивный», представляет собой ингибирование роста при повы-

шении концентрации ксенобиотика в исследуемом концентрационном диапазоне. При ответе второго типа в исследуемом концентрационном диапазоне ингибирование роста отсутствует. Аналогичные типы ответа были получены при культивировании штаммов азотфиксирующих бактерий в концентрационном градиенте НХБ (рис. 2).

На примере штамма N6 показан ответ первого типа, а на штамме N1 — второго. Однако в обоих случаях наблюдали снижение количества выживших клеток культур в присутствии органического ксенобиотика даже при его незначительной концентрации (30 мг/л). Таким образом, в границах исследуемого концентрационного диапазона штамм N6 более устойчив к НХБ по сравнению со штаммом N1, несмотря на то, что предельно допустимые концентрации НХБ у них одинаковы.

Проявление устойчивости к НХБ можно объяснить существованием защитных механизмов у азотфиксирующих бактерий, а также способностью взаимодействовать с ним. Известны две группы механизмов взаимодействия микроорганизмов с ароматическими соединениями: восстановительная деструкция и окисление. Так, ароматические соединения могут служить источниками углерода и энергии для азотфиксирующих бактерий [1]. Механизм восстановительной трансформации на примере азобензола был показан для азотфиксирующего штамма *Ochrobactrum intermedium* ANKI. Способность такой трансформации может быть связана с Mo-зависимой нитрогеназной активностью штамма [10].

Нами установлено, что исследуемые штаммы не только устойчивы к высоким концентрациям НХБ, но и взаимодействуют

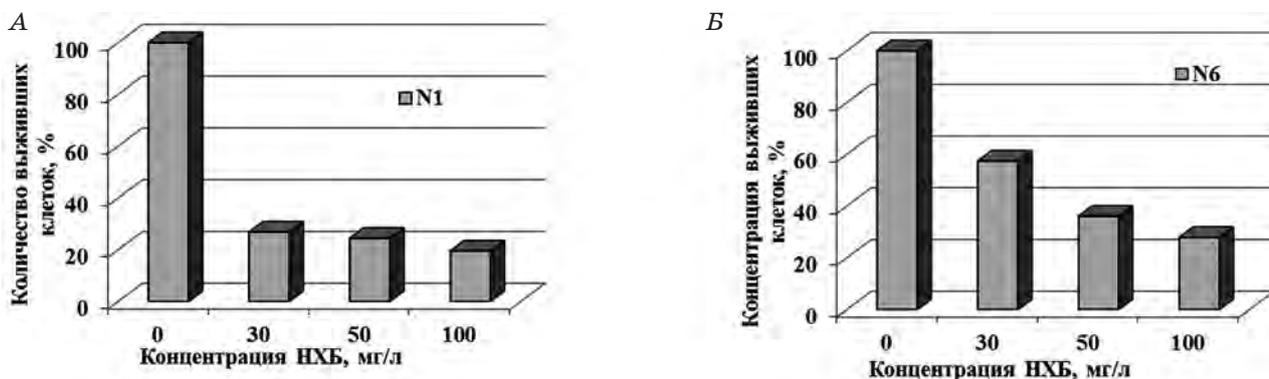


Рис. 2. Типы ответа штаммами азотфиксирующих бактерий карстовых полостей на действие НХБ:

А — ответ первого типа, $**r = -0,89, P \leq 0,05$;

Б — ответ второго типа, $*r = -0,76, P \leq 0,05$

с ним, разрушая ароматическое кольцо. Об этом свидетельствует отсутствие поглощения в ультрафиолетовой области при 230 нм. Поглощение в этой области определяется наличием ненасыщенных связей в ароматическом кольце. Концентрация НХБ в среде снижалась в 2–13 раз в зависимости от штамма.

Способность азотфиксирующих штаммов использовать атмосферный азот и расти при малых концентрациях органических соединений в сочетании со способностью разрушать НХБ может быть использована для создания новых природоохранных биотехнологий для очистки промышленных сточных вод от органических ксенобиотиков.

Количественные параметры устойчивости к трем классам экстремальных факторов штаммов азотфиксирующих бактерий карстовых полостей сходны с параметрами для азотфиксирующих бактерий почвенных наземных экосистем. Исследуемые азотфиксирующие бактерии чувствительны к действию УФ-облучения и неорганических ксенобиотиков, в частности Cu^{2+} . Штаммы

высокоустойчивы к органическому ксенобиотику НХБ в сверхвысоких концентрациях и взаимодействуют с ним, снижая его концентрацию в среде.

Принимая во внимание то, что азотфиксирующие микроорганизмы являются ключевой группой цикла азота, а также их высокую устойчивость к НХБ, можно предположить возможность автобиоремедиации глин карстовых полостей микробными сообществами при загрязнении этих экосистем органическими ксенобиотиками. Возможно использование выделенных штаммов в качестве деструкторов ксенобиотиков для биоремедиации почв в агробиотехнологиях, а также для улучшения азотного питания растений наземных экосистем.

Выражаем благодарность группе спелеологов и лично Ольге Ткачевой (Украинская спелеологическая ассоциация) за сотрудничество и помощь в отборе образцов глин в карстовых полостях Мушкарова Яма и Куйбышевская.

REFERENCES

1. Maltsev V. A., Korshunov V. V., Semikolenykh A. A. Cave chemolithotrophic soils. *Proceedings of 12th Congress of Speleology. La-Chaux-de-Fonds. Switzerland. 1997*, V. 1, P. 29–32.
2. Northup D. E., Lavoie K. H. Geomicrobiology of caves. A review. *Geomicrob. J.* 2001, 18 (3), 199–220.
3. Netrusov A. I., Egorova M. A., Zaharchuk L. M., Kolotilova N. N. Practicum on Microbiology. Handbook. *Moscow: Akademiia.* 2005, 608 p. (In Russian).
4. Zavarzin G. A. Lectures on natural science of microbiology. *Moscow: Nauka.* 2003, 348 p. (In Russian).
5. Zap R. G., Callaghan T. V., Erickson D. J. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1998, V. 46, P. 69–82.
6. Dobrovolskiy V. V. Soils geography with bases of soil science. *Moscow: Vlados.* 2001, 246 p. (In Russian).
7. Tashyrev O. B., Tashyreva G. O. Vojcic'kij V. M. Studying the impact of heavy metals on Antarctic soil-substrate microbial communities. *VISNYK Kyiv nats. un-ty imeni Tarasa Shevchenka.* 2004, N 42, P. 17–19. (In Ukrainian).
8. Tashyrev A. B., Romanovskaya V. A., Rokitko P. V., Tashyreva. Multiple resistance to toxic metals of Antarctic cliffs microorganisms (Galindez Island). *Ukr. antarktychnyi zh.* 2011–2012, N 11–12, P. 212–221. (In Russian).
9. Tashyrev O. B., Prekrasna Ie. P., Tashyreva G. O. Method of thermodynamic prognosis for new environmental biotechnologies development. *J. Int. Sci. Publ.: Agriculture&Food.* 2013, 1 (2), 92–110.
10. Vakerov-Kouzona N. D. Nitrogen-fixing bacteria *Ochrobactrum intermedium* ANKI transformed azobenzene. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya.* 2007, V. 43, P. 450–454. (In Russian).

СТІЙКІСТЬ АЗОТФІКСУЮЧИХ БАКТЕРІЙ КАРСТОВИХ ПОРОЖНИН ДО ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ФАКТОРІВ

О. В. Таширеві¹
О. С. Сулова¹,
П. В. Рокитко¹
Г. О. Олексенко²
К. М. Бондарь³

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

²Національний університет «Києво-
Могилянська академія», Україна

³Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна

E-mail: olga.suslova11@gmail.com

Метою роботи було встановлення кількісних показників стійкості досліджених бактерій до екстремальних факторів — токсичних металів (Cu^{2+}), органічних ксенобіотиків (*n*-нітрохлорбензол) та УФ-опромінення. Протестовано шість штамів азотфіксуючих бактерій, що їх було виділено зі зразків глин двох карстових порожнин — Мушкаророва Яма (Поділля, Україна) та Куйбишевська (Західний Кавказ, Абхазія), а також референтний штам *Azotobacter vinelandii* УКМ В-6017. Для цього визначали максимально допустимі концентрації Cu^{2+} та *n*-нітрохлорбензолу в концентраційному градієнті й летальні дози УФ за кривими виживаності. Максимально припустимі концентрації для штамів: 10 мг/л Cu^{2+} , 70–120 мг/л *n*-нітрохлорбензолу. Максимальні дози УФ варіюють у діапазоні 55–85 Дж/м² (LD_{99,99}). Показано, що за показниками стійкості до трьох класів екстремальних факторів виділені штами карстових порожнин подібні до штаму наземних ґрунтових екосистем. Найбільш активні досліджувані штами здатні знижувати концентрацію *n*-нітрохлорбензолу в середовищі в 13 разів. Явище деструкції *n*-нітрохлорбензолу азотфіксуючими бактеріями може бути використано для створення нових природоохоронних біотехнологій для очищення промислових стічних вод від нітрохлорароматичних ксенобіотиків. Виділені штами можуть бути застосовані як деструктори для біоремедіації ґрунтів в агробіотехнологіях, а також для оптимізації азотного живлення рослин наземних екосистем.

Ключові слова: карстові порожнини, азотфіксуючі бактерії, природоохоронні біотехнології.

RESISTANCE OF KARST CAVERNS NITROGEN-FIXING BACTERIA TO EXTREME FACTORS

O. B. Tashyrev¹
O. S. Suslova¹
P. V. Rokitko¹
H. O. Oleksenko²
K. M. Bondar³

¹Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²National University of «Kiyv-Mohyla
Academy», Ukraine

³National Taras Shevchenko University, Kyiv,
Ukraine

E-mail: olga.suslova11@gmail.com

To determine the studied bacteria resistance quantitative parameters of extreme factors such as toxic metals (Cu^{2+}), organic xenobiotics (*p*-nitrochlorobenzene) and UV-irradiation were the aim of the research. Six strains of nitrogen-fixing bacteria isolated from clays of two caverns Mushkarova Yama (Podolia, Ukraine) and Kuybyshevskaya (Western Caucasus, Abkhazia) and *Azotobacter vinelandii* UKM B-6017 as a reference strain have been tested. For this purpose the maximum permissible concentration of Cu^{2+} and *p*-nitrochlorobenzene in the concentration gradient and lethal doses of UV by the survival caverns have been determined. Maximum permissible concentrations for strains were as 10 ppm Cu^{2+} , 70–120 ppm of *p*-nitrochlorobenzene. The maximum doses of UV-irradiation varied in the range of 55–85 J/m² (LD_{99,99}). It is shown that three classes of extreme factors resistance parameters of karst caverns strains are similar to the strain of terrestrial soil ecosystems. The most active studied strains reduce the concentration of *p*-nitrochlorobenzene in the medium in 13 times. The ability of nitrogen-fixing bacteria to degrade *p*-nitrochlorobenzene could be used in creation new environmental biotechnology for industrial wastewater treatment from nitrochloroaromatic xenobiotics. Isolated strains could be used as destructors for soils bioremediation in agrobiotechnologies and to optimize plants nitrogen nutrition in terrestrial ecosystems.

Key words: karst caverns, nitrogen-fixing bacteria, environmental biotechnology.