

**УСТОЙЧИВОСТЬ К УФ ИЗЛУЧЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ НАСКАЛЬНЫХ БИОТОПОВ
АНТАРКТИКИ***

*Микробиологический анализ наземных биотопов Антарктики показал, что открытые для Солнца вертикальные скалы на антарктических островах характеризуются особыми микроценозами. Установлено широкое распространение пигментированных микроорганизмов в наскальных антарктических образцах и более высокая частота их встречаемости, чем в других антарктических биотопах. Впервые показано наличие на вертикальных скалах в Антарктике бактерий и дрожжей, резистентных к высоким дозам УФ излучения, летальным для многих микроорганизмов. Летальная доза УФ облучения для антарктических розовопигментированных штаммов *Methylobacterium* превышала 200–300 Дж/м², для угольно-чёрных дрожжей – 500–800 Дж/м², для красных дрожжей – 1200–1500 Дж/м². Не обнаружено различий в летальном эффекте УФ относительно штаммов *Methylobacterium*, изолированных из регионов с различным климатом. Возможно, адаптация наскальных микроценозов к экстремальным факторам окружающей среды происходит путём естественной селекции микроорганизмов, у которых устойчивость к этому фактору генетически детерминирована.*

Ключевые слова: Антарктика, скалы на островах, пигментированные микроорганизмы, резистентность к УФ излучению.

Географическая изолированность островов Антарктики, озоновая «дыра», которая обуславливает высокий уровень ультрафиолетового излучения, а также низкая температура сформировали особый микромир в Антарктике. Ранее представлены результаты наших исследований относительно биоразнообразия микроорганизмов в этом регионе [5, 7]. Вместе с тем, мы предположили, что вертикальные скалы на островах Антарктики, практически всегда открытые для Солнца, должны характеризоваться особыми микроценозами, в частности микроорганизмами, устойчивыми к УФ излучению. Поэтому целью нашей работы было изучение наскальных антарктических микроценозов и их устойчивости к УФ облучению.

Материалы и методы. *Объекты исследования и их культивирование.* Образцы для микробиологических исследований отбирали стандартными методами на скалах островов в Антарктике. Исследовали следующие биотопы: лишайники, почва, мхи. Хемоорганотрофные аэробные микроорганизмы выделяли из нативных (хранение при температуре +5°C, 10 суток) образцов (экспедиция 2008 г.). Количество микроорганизмов в исследуемых образцах определяли путём посева последовательных десятикратных разведений образцов (0.1 мл) на агаризованные питательные среды: NA – «Nutrient Agar» (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.), CA – сусло агар и минеральную среду MM [1] с метанолом (0,5 об.%) в качестве источника углеродного питания. Агаризованную среду (ММА) готовили на основе среды MM с метанолом, добавляя 2 % агара Дифко. Для подавления грибной микрофлоры в среду NA и ММА добавляли 50 мг нистатина на 1 л среды. Эксперименты проводили в трех повторностях (15–20°C, 5–15 суток).

Устойчивость к ультрафиолетовому излучению. Антарктические микроорганизмы выращивали на жидком сусле (дрожжи) и на минеральной среде MM (бактерии) [1]. Десятикратные разведения (от 10⁻² до 10⁻⁷) двух- или трёхсуточной культуры наносили (по 0.1 мл) на чашки Петри с агаризованными средами и равномерно растирали шпателем по всей поверхности. Открытые чашки помещали на расстоянии 1 м от источника облучения (лампа БУФ-15, λ=254 нм). Облучение УФ проводили от 1 до 60 мин (40–2400 Дж/м²). Дозу облучения (Дж/м²) определяли с помощью дозиметра ДАУ-81. После облучения чашки помещали в

*Работа выполнялась согласно Международного проекта Государственного фонда фундаментальных исследований Украины и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф28.4/030, договор №Ф28/417) «Термофильные и психрофильные аэробные метилотрофные бактерии: экофизиология, адаптация и филогения».

термостат (+15°C – +30°C). УФ облучение и дальнейшую инкубацию облученных микроорганизмов проводили в темноте, чтобы избежать фоторепарации. Подсчет выросших на чашках колоний (КОЕ) проводили через 5–15 суток и определяли количество бактерий, выживших после УФ облучения (в пересчете на 1 мл бактериальной суспензии). Количество клеток в исходной суспензии (до УФ облучения) определяли путем посева микробной суспензии из тех же последовательных десятикратных разведений на соответствующие агаризованные среды. Выживаемость микроорганизмов (а также летальную дозу) после различных доз УФ облучения оценивали по изменению процентного содержания выживших клеток от их исходного количества до облучения.

Результаты и их обсуждение. Проведен микробиологический анализ 60-ти наскальных образцов островов Аргентинского архипелага (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Cruls, Three little pig, King-Georg), а также близлежащих к ним островов (с севера – Petermann, с востока – группа островов Jalour, с юго-востока – Berthelot); и более удалённых от них островов (Darboux, Lippmann, Voorth). На скалах этих островов широко представлены различные типы лишайников, имеются большие террасы, покрытые моховыми полями, либо отдельные пятна мха. Как мы и предполагали, вертикальные скалы на островах Антарктики, практически всегда открытые для Солнца, характеризуются особыми микроценозами. Прежде всего, было показано широкое распространение в них пигментированных микроорганизмов. Так, в наскальных антарктических образцах частота встречаемости пигментированных микроорганизмов, а также их общее количество значительно выше, чем в других антарктических биотопах, описанных нами ранее [5, 7]. Среди пигментированных форм выявлено (клеток/г образца):

бактерии: розово-красные (10^6), желтые (10^3 – 10^6), оранжевые (10^2 – 10^6);
дрожжи: красные (10^5 – 10^6), чёрные (10^3 – 10^4);
микромитцы: бурые (10^3), чёрные (10^3).

Микроскопия пигментированных антарктических микроорганизмов показала, что часть из них представлена дрожжами: угольно-чёрными и красными. Угольно-чёрные дрожжи подобны *Exophiala nigra* (Issatsch.) Naase et de Hoog 1999. Более подробно они описаны нами в работе [6]. Их основным местообитанием являются накипные и кустистые лишайники на скалах, реже они обнаружены в почве. В исследованных наскальных биотопах красные дрожжи выявляются чаще, чем чёрные. Помимо лишайников, они обнаружены на мхах.

Розово-красные бактерии по комплексу диагностических признаков могут быть отнесены к роду *Methylobacterium*. Клетки: грамотрицательные палочки, до 1.5 мкм длиной. Колонии: розово-пигментированные, или красные, 2–4 мм. Хемоорганотрофы, облигатные аэробы, растут в диапазоне температур 10°C–30°C и в диапазоне pH 6.0–7.0. В качестве единственного источника углерода и энергии, помимо других органических соединений, способны использовать метанол (т.е., они являются факультативными метилотрофами). Штаммы *Methylobacterium* обнаружены (10^2 – 10^3 клеток/г образца) во мхе скальных трещин; на розовых, оранжевых и темно-окрашенных лишайниках на скалах в Антарктике.

Считается, что пигментированные микроорганизмы более устойчивы к УФ облучению, чем бесцветные. К тому же мы предполагали, что у наскальных антарктических микроорганизмов, которые подвергаются воздействию высокого уровня солнечной радиации, должна сформироваться повышенная резистентность к УФ. Поэтому было отобрано 8 антарктических пигментированных штаммов (угольно-чёрных и красных дрожжей, а также розовопигментированных бактерий рода *Methylobacterium*) для изучения влияния УФ облучения на их выживаемость (таблица).

**Список штаммов пигментированных микроорганизмов,
использованных в работе для УФ облучения**

№ шт.	Пигментация	Штамм изолирован из экосистемы	
		Остров	Биотоп
Пигментированные антарктические дрожжи			
14с	Красные	Three little pig	Лишайники
33с	Красные	Lippmann	Мох с почвой
36с	Черные	Irizar	Почва с камнями
48с	Красные	Darboux	Мох на склоне скалы
2299	Черные	Galindez	Черные накипные лишайники на скале
Пигментированные антарктические бактерии (<i>Methylobacterium</i>)			
53m	Розовые	Berthelot	Мох на скале
50m	Розовые	Darboux	Кустистый лишайник на скале
0-11	Розовые	Galindez	Ил со мхом
*Тест-культуры <i>Methylobacterium</i> (контрольные)			
21ch	Розовые	Киев	Мох с почвой
18ch	Розовые	ЧАЭС	Мох с почвой
Непигментированные антарктические бактерии			
25m	Бесцветные	**гора Waugh	Моховая поляна расположена на небольшой террасе среди камней

Примечание. *Контрольные штаммы *Methylobacterium*, изолированные ранее из региона с умеренным климатом. **Западное побережье Антарктического полуострова.

Показано, что антарктические штаммы рода *Methylobacterium* (50m, 53m, 0-11) устойчивы к УФ облучению, уровень устойчивости к УФ у них примерно одинаков (рис 1). Вместе с тем возник вопрос: отличается ли уровень устойчивости к УФ антарктических метилотрофов по сравнению с коллекционными штаммами, которые были ранее изолированы из регионов с умеренным климатом? Как следует из дозовых кривых на рис. 1, разницы относительно устойчивости к УФ между антарктическими метилотрофами (штаммы 50m, 53m, 0-11) и коллекционными (штаммы 21ch, 18ch) не наблюдалось. Ранее нами также было показано, что коллекционные штаммы *Methylobacterium* устойчивы к УФ облучению [2]. ЛД_{99,99} (т.е., так называемая, летальная доза УФ, при которой погибает 99,99 % клеток) для антарктических и коллекционных штаммов *Methylobacterium* составляла 200-300 Дж/м² (рис. 1, 2), в то время как бесцветные антарктические бактерии (штамм 25m) чувствительны к УФ (рис. 1). ЛД_{99,99} УФ для штамма 25m составляла 60 Дж/м², что несколько превышает данный показатель (13-40 Дж/м²) для других бесцветных бактерий, изолированных из регионов с умеренным климатом [3].

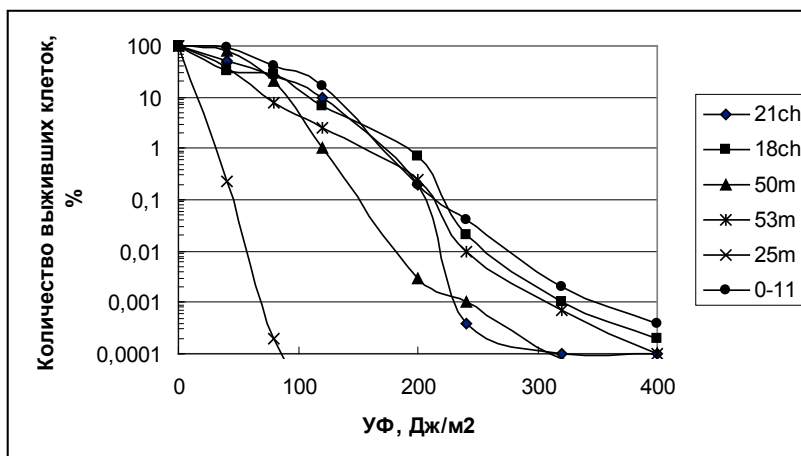


Рис. 1. Выживаемость штаммов *Methylobacterium* при различных дозах УФ облучения

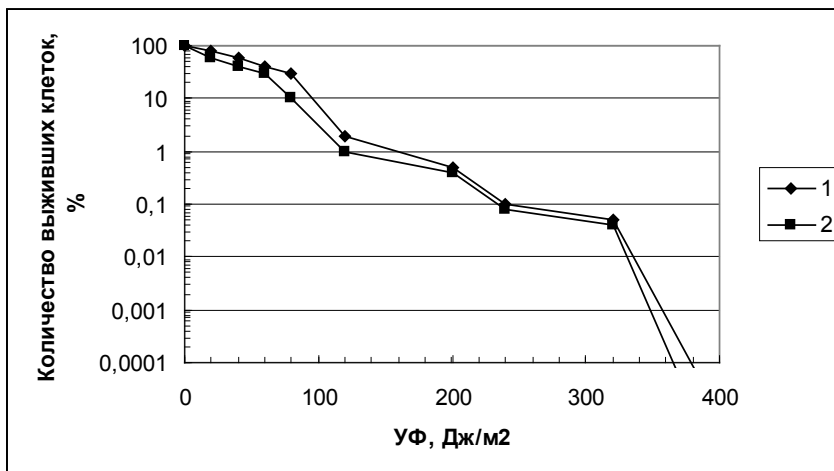


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости *Methylobacterium extorquens* 53м после УФ облучения и дальнейшей инкубации на свету (1) и в темноте (2)

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. Репарация этих повреждений может происходить в результате облучения видимым светом (длинноволновые УФ лучи) даже в пострadiационный период [4]. Чтобы проверить это, инкубацию облученных микроорганизмов проводили как в темноте (чтобы избежать фоторепарации), так и при естественном освещении. Оказалось, что дозовые кривые выживаемости клеток после УФ облучения практически совпадают (рис. 2). Это свидетельствует, что именно способность к темновой репарации определяет уровень резистентности к УФ у исследованных штаммов.

Изучена чувствительность антарктических дрожжей *Exophiala nigra* к УФ (рис. 3). Как следует из представленного графика, для угольно-чёрных дрожжей ЛД_{99,99} УФ составляла 500–800 Дж/м², что говорит о высокой резистентности исследованных дрожжей к ультрафиолету. Антарктические на скальные красные дрожжи характеризовались ещё большей устойчивостью к УФ облучению, ЛД_{99,99} УФ составляла 1200–1500 Дж/м² (рис. 4). То, что дрожжи более устойчивы, чем бактерии, закономерный факт, т.к. клетки с диплоидным и полиплоидным набором хромосом устойчивее к УФ, чем гаплоидные микроорганизмы.

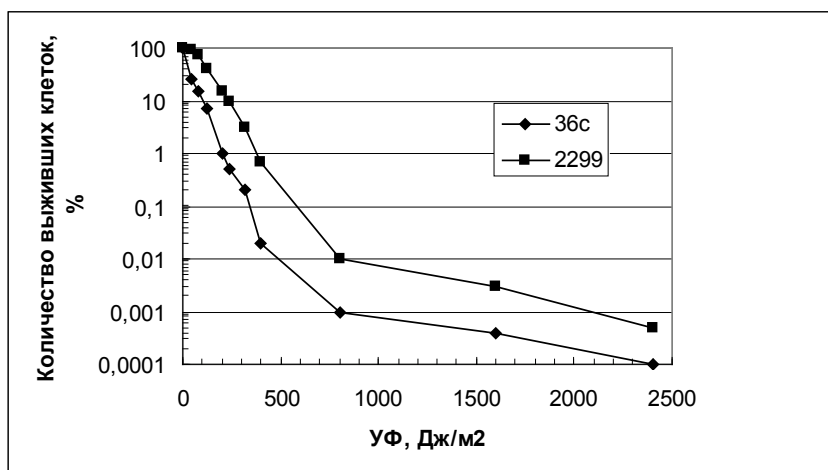


Рис. 3. Выживаемость антарктических угольно-чёрных дрожжей *Exophiala nigra* при различных дозах УФ облучения

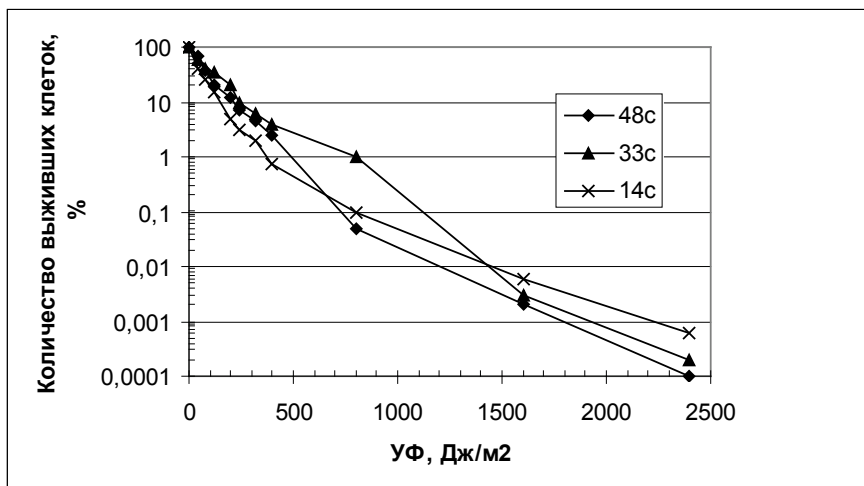


Рис. 4. Дозовые кривые выживаемости антарктических красных дрожжей после УФ облучения

Т.о., в наскальных антарктических образцах частота встречаемости пигментированных микроорганизмов, а также их общее количество и биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах. Впервые показано наличие на вертикальных скалах в Антарктике бактерий и дрожжей, резистентных к высоким дозам УФ излучения, которые летальны для многих микроорганизмов. Как уже сообщалось выше, данная антарктическая экосистема характеризуется комплексом абиотических экстремальных факторов (высокие дозы УФ излучения, низкая температура, продукты извержения вулканов). Возможно, адаптация микробных ценозов к экстремальным факторам окружающей среды (например, высокий уровень солнечной радиации), происходит путём естественной селекции микроорганизмов, у которых устойчивость к этому фактору генетически детерминирована. Иными словами, из числа аллохтонных микроорганизмов (виды микроценоза, занесенные из других регионов) и даже из числа автохтонных микроценозов (аборигенная микрофлора) приспособляются к изменяющимся условиям окружающей среды те микроорганизмы, которые способны реализовать определённую стратегию выживания. Видимо, в условиях увеличения уровня солнечной радиации в Антарктике преимущество для выживания на скалах получили микроорганизмы, которые имели эффективные системы нейтрализации перекисных соединений, и/или механизмы репарации повреждений ДНК, и/или пигменты, предохраняющие клетки от солнечной радиации.

В.О. Романовська, О.Б. Таширев, С.О. Шилин, Н.А. Черная

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

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО УФ ОПРОМІНЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ НАСКЕЛЬНИХ БІОТОПІВ АНТАРКТИКИ

Резюме

Мікробіологічний аналіз наземних біотопів Антарктики показав, що відкриті для Сонця вертикальні скелі на антарктичних островах характеризуються особливими мікроценозами. Встановлено широке різноманіття пігментованих мікроорганізмів у наскальних антарктичних зразках, більш висока частота їх виявлення, порівняно з іншими антарктичними біотопами. Вперше показана наявність на вертикальних скелях в Антарктиці бактерій та дріжджів, резистентних до доз УФ опромінення, летальних для більшості відомих мікроорганізмів. Летальна доза УФ опромінення для антарктичних рожевопігментованих штамів *Methylobacterium* була вище за 200–300 Дж/м², для вугільно-чорних дріжджів – 500–800 Дж/м², для червоних дріжджів – 1200–1500 Дж/м². Не виявлено різниці в летальному ефекті УФ щодо штамів *Methylobacterium*, які були ізовані із регіонів з різним кліматом. Можливо, адаптація наскальних мікроценозів до екстремальних факторів довкілля відбувається шляхом природної селекції мікроорганізмів, у яких резистентність до даного фактору генетично детермінована.

Ключові слова: Антарктика, скелі на островах, пігментовані мікроорганізми, резистентність до УФ опромінення.

RESISTANCE TO UV RADIATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE ROCK BIOTOPES OF THE ANTARCTIC REGION

S u m m a r y

Microbiological analysis of terrestrial biotopes of the Antarctic Region has shown, that vertical rocks of the Antarctic islands open for the Sun were characterized by special microcenoses. The wide distribution of pigmented microorganisms in the rock Antarctic samples, a higher frequency of their occurrence, the total number and biologic diversity, than in other Antarctic biotopes, has been demonstrated. For the first time the presence of bacteria and yeast, resistant to high doses of UV radiation on the vertical rocks in the Antarctic Region was shown. The lethal dose of UV radiation for the Antarctic pink pigmented *Methylobacterium* strains exceeded 200–300 J/m², for coal-black yeast – 500-800 J/m², for red yeast – 1200-1500 J/m². The distinctions in lethal UV effect against strains of *Methylobacterium* isolated from the regions with different climate have not been found. Probably, adaptation of the rock microcenosis to extreme factors of the environment proceeds by natural selection of microorganisms, which resistance to this factor is genetically determined.

The papers is presented in Russian.

K e y w o r d s: the Antarctic Region, rocks on islands, pigmented microorganisms, resistance to UV radiation.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s : Romanovskaya V.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Романовская В.А., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Микробиол. журнал. – 1996. – 58, № 3. – С. 3–11.
2. Романовская В.А., Рокитко П.В., Малащенко Ю.Р., Чорная Н.А. Чувствительность к стрессовым факторам почвенных бактерий, изолированных из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Микробиология. – 1999. – 68, № 4. – С. 534–539.
3. Романовская В.А., Малащенко Ю.Р., Соколов И.Г., Рокитко П.В. Мутабельность эпифитных и почвенных бактерий рода *Methylobacterium* и их устойчивость к УФ и ионизирующему излучению // Микробиология. – 1998. – 67, № 1. – С. 106–115.
4. Самойлова К.А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. Ленинград: Наука, 1967. – 146 с.
5. Таширева А.Б., Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Черная Н.А., Таширева А.А. Микробиологический анализ наземных биотопов Антарктики // Микробиол. журнал. – 2010. – 72, № 2. – С. 3–9.
6. Таширев А.Б., Романовская В.А., Шилин С.О., Черная Н.А. Скрининг дрожжей-продуцентов меланина из наземных антарктических биотопов // Микробиол. журнал. – 2010. – 72, № 1. – С. 3–8.
7. Romanovskaya V.A., Tashyrev O.B., Ter-Kazarian S.Sh. Microbial diversity in typical biotopes of islands of the Argentina archipelago (the Western Antarctic Region) // III Int. Conf. "Microbial Diversity: Current Situation, Conservation Strategy and Biotechnological Potentialities ICOMID 2008". (Perm, 27 Sept. – 5 Oct, 2008). Perm – N. Novgorod – Perm, 2008. – P. 189–190.

Отримано 14.04.2009