

УДК 579.26

*В.А. Романовская¹, А.Б. Таширев², С.О. Шилин¹, Н.А. Черная¹,
П.В. Рокитко¹, А.С. Левишко¹*

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина

²Национальный антарктический научный центр МОН Украины

УСТОЙЧИВОСТЬ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ К УФ РАДИАЦИИ

Из биоплёнок обрастания 11-ти стационарных пунктов мониторинга на вертикальной скале биогеографического полигона (остров Galindez, Антарктика) изолированы микроорганизмы, доминирующие в этих образцах. Они представлены морфологически разнообразными формами бактерий ($n \times 10^7$ клеток в 1г образца), дрожжами ($n \times 10^5$) и грибами ($n \times 10^4 - 10^6$). Определены пороговые и летальные дозы УФ для изолированных монокультур антарктических микроорганизмов. Пороговая доза УФ радиации, которая является мерой способности клеток к репарации поврежденных ДНК, для бактерий составляла 40-70 Дж/м². Летальная доза УФ (ЛД_{99,99}) для бактерий варьировала в пределах 200-480 Дж/м², для дрожжей 700-1200 Дж/м². Резистентность к УФ радиации проявили как пигментированные, так и непигментированные бактерии. Как правило, грамположительные бактерии были более устойчивы к УФ, чем грамотрицательные. Показано, что резистентность к УФ радиации у исследованных антарктических наскальных микроорганизмов является генетически стабильным признаком.

Ключевые слова: Экстремофильные микроорганизмы, Антарктика, УФ радиация.

Наиболее экстремальными биотопами Антарктики являются отвесные скалы, которые занимают значительную площадь островов и побережья (более 50 %). Ранее нами установлено, что в наскальных антарктических образцах (в различных регионах) широко распространены пигментированные микроорганизмы. Показано, что в исследованных биотопах имеются микроорганизмы, резистентные к высоким дозам УФ излучения [5]. Эта работа [5] была, в основном, выполнена с микробными ценозами, т.е. с природными ассоциациями микроорганизмов. Цель данной работы – определить пороговые и летальные дозы УФ для монокультур антарктических микроорганизмов, оценить генетическую стабильность данного признака у них и стратегию выживания микроорганизмов при высоком уровне УФ радиации в Антарктике.

Материалы и методы. Объектом исследования служили антарктические микроорганизмы, изолированные из образцов чёрных накипных лишайников, отобранных на вертикальной скале (высота 10-15 м, длина около 20 м). Скала расположена на биогеографическом полигоне (Украинская станция Академик Вернадский, остров Galindez, западная Антарктика) и покрыта мощной биоплёнкой обрастания. Выбор данного объекта обусловлен тем, что отвесные скалы Антарктики максимально подвержены экстремальному действию УФ радиации. Образцы хранили при +5°C.

Выделение антарктических микроорганизмов. Микроорганизмы выделяли на агаризованных питательных средах: NA – «Nutrient Agar» (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.), SA – сусло агар и минеральная среда MM [4] 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 роста микромицетов в среду NA и ММА добавляли 50 мг нистатина на 1 л среды. Десятикратные разведения образцов рассеивали на указанные среды и инкубировали при 15–20°C (5–15 суток). Для выделения чистых культур использовали доминирующие в образцах микроорганизмы. Для этого с чашек, где общее количество колоний не превышало 50-ти, отбирали единичные колонии. Выделение чистых культур осуществляли общепринятыми методами. Морфологию клеток изучали микроскопированием живых и окрашенных по Граму препаратов стандартными методами.

Устойчивость к ультрафиолетовому излучению (УФ-С). Десятикратные разведения (от 10^{-2} до 10^{-7}) двух- или трёхсуточных микробных суспензий наносили монослоем (по

© В.А. Романовская, А.Б. Таширев, С.О. Шилин, Н.А. Черная, П.В. Рокитко, А.С. Левишко, 2011

0.05-0.1 мл) на чашки Петри с агаризованными средами (NA, CA, MMA) и равномерно растерли шпателем по всей поверхности. Открытые чашки помещали на расстоянии 1 м от источника облучения (лампа БУФ-15, $\lambda=254$ нм). Длительность УФ облучения – от 1 до 60 мин (40–2400 Дж/м²). Дозу облучения (Дж/м²) определяли с помощью дозиметра ДАУ-81. После облучения чашки инкубировали при температуре 15–20°C. УФ облучение и дальнейшую инкубацию облученных микроорганизмов проводили в темноте, чтобы избежать фоторепарации. Подсчет выросших на чашках колоний проводили через 2–10 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 посева микробной суспензии из тех же последовательных десятикратных разведений на соответствующие агаризованные среды. Выживаемость микроорганизмов (а также летальную дозу) после УФ облучения оценивали по изменению процентного содержания выживших клеток после различных доз УФ облучения от их исходного количества.

Чтобы сравнить чувствительность к УФ различных монокультур, на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычисляли:

ЛД₉₀ – дозу УФ, при которой погибает 90 % клеток.

ЛД_{99,99} – дозу УФ, при которой погибает 99,99 % клеток.

Пороговую дозу УФ определяли, опуская на ось абсцисс перпендикуляр АВ из точки А (см. рис. 1 в разделе «Результаты»). Точка А находится на пересечении экстраполированного прямолинейного участка кривой выживаемости с прямой, которая параллельна оси абсцисс и проведена на уровне 100 % выживаемости [7, 10]. Перпендикуляр АВ отсекает на оси абсцисс величину, которая соответствует пороговой дозе УФ.

Результаты и их обсуждение. Из 11-ти образцов, отобранных в стационарных пунктах мониторинга, было изолировано 20 штаммов микроорганизмов, которые доминировали в биоплёнке обрастания скалы. Они были представлены различными морфотипами бактерий ($n \times 10^7$ клеток/г образца) и дрожжей ($n \times 10^5$ клеток/г образца). Грибы (микромикеты) также присутствовали в значительном количестве ($n \times 10^4$ - $n \times 10^6$ клеток/г образца). Основным критерием для определения различных морфотипов колоний служила совокупность следующих их признаков: пигментация, выделение водорастворимого пигмента, образование внеклеточной слизи, консистенция, размер (мм), наличие воздушного и субстратного мицелия и другие характерные признаки.

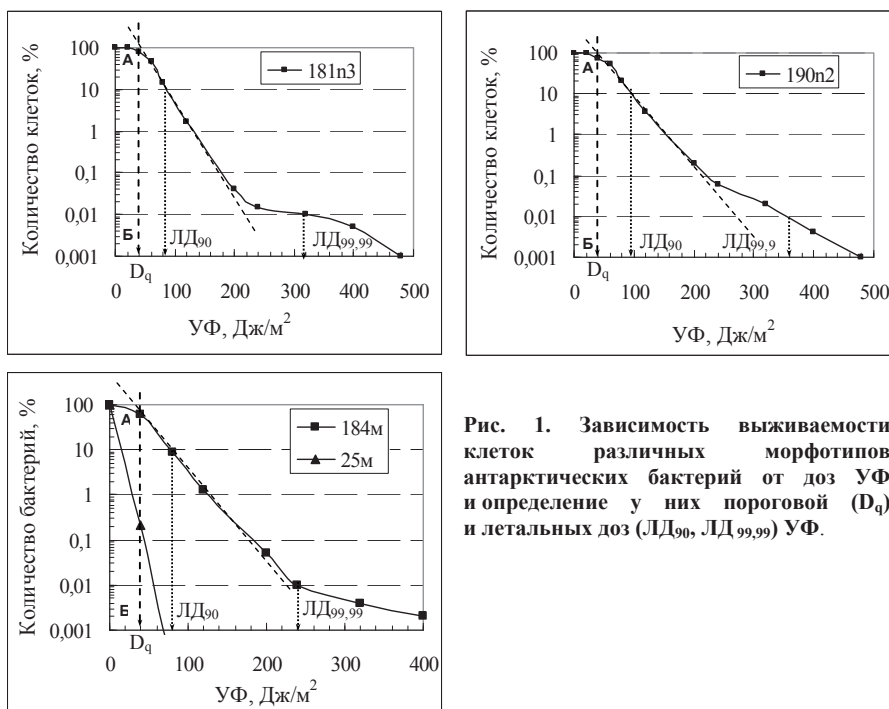


Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток различных морфотипов антарктических бактерий от доз УФ и определение у них пороговой (D_q) и летальных доз (ЛД₉₀, ЛД_{99,99}) УФ.

На рис. 1 приведены результаты облучения УФ наиболее распространённых доминирующих морфотипов бактерий, изолированных из биоплёнки обрастания. Они представлены грамположительными крупными палочками, не образующими спор (актинобактерии): 181n3 (оранжевые колонии, до 5 мм), 190n2 (белые колонии, до 3 мм); а также грамотрицательными метилотрофными бактериями: 184 м (розово-красные колонии, 2–4 мм). Летальные дозы УФ для этих штаммов варьировали в пределах: $LD_{99,99}$ – 240–360 Дж/м², LD_{90} – 80–100 Дж/м²; пороговая доза – 40–50 Дж/м². Пороговая доза радиации является мерой способности клеток к репарации повреждений ДНК, поэтому данный показатель важен для характеристики резистентности бактерий к УФ радиации. Более того, известно, что доза УФ 40–50 Дж/м², которая для исследованных антарктических бактерий было только пороговой, оказывает летальное действие на многие виды бактерий (например, на псевдомонады, метанотрофы и др. [1–3, 6, 9]).

Для некоторых антарктических бактерий пороговую дозу не представлялось возможным вычислить, поскольку дозовая кривая, отражающая зависимость выживаемости клеток от доз УФ, не имела плеча (рис. 1, штамм 25 м). Аналогичный результат (отсутствие плеча на дозовой кривой) был получен при изучении чувствительности дрожжей к УФ (рис. 2). Вместе с тем, дрожжи были устойчивее к УФ, чем бактерии, летальная доза УФ ($LD_{99,99}$) для дрожжей составляла 700–1200 Дж/м² (рис. 2). Перечень исследованных монокультур и полученные результаты суммированы в таблице.

Таблица

Пороговые (D_q) и летальные дозы УФ (LD_{90} , $LD_{99,99}$) для антарктических микроорганизмов, изолированных из биоплёнок обрастания на скале (остров Galindez, Антарктика)

№.№ штаммов	Морфотип колоний	D_q	$D_{ж/м^2}$	
			LD_{90}	$LD_{99,99}$
Грамположительные палочки, спор не образуют (актинобактерии)				
180n1	От белых до серых, плоские, блестящие, до 13 мм, при старении коричневые, выделяют зеленый пигмент в агар	60	85	200
181n2	Желтые, блестящие, гладкие, 3-4 мм	70	125	320
181n3	Оранжевые, маслянистые, 3-5 мм	50	85	320
182n1	Розовые, гладкие, блестящие, менее 3 мм	50	60	480
187n3	Оранжевые, плоские, круглые, до 10 мм	нет	50	200
188n2	Бурые, блестящие, плоские, 3-4 мм	60	115	480
190n1	Розово-оранжевые, плоские, блестящие, 3-4 мм	нет	30	310
190n2	Белые, непрозрачные, до 3-х мм	55	105	360
Грамотрицательные бактерии				
25м	Белые метилотрофы, 3-4 мм	нет	20	60
15м	Жёлтые, слизистые, метилотрофы, до 5-6 мм	нет	20	50
184м	Розово-красные метилотрофы, 2-4 мм	40	80	240
187n31	Красные, выпуклые, до 3 мм	нет	40	120
Дрожжи				
181с	Угольно-чёрные, 10-12 мм	нет	130	700
182с	Красные, 4-5 мм	нет	240	1200

Как показано (таблица), летальные дозы УФ для этих микроорганизмов варьировали в пределах: $LD_{99,99}$ – 200-1200 Дж/м², LD_{90} – 30-240 Дж/м². Исключение составляли некоторые жёлтопигментированные и белые метилотрофные бактерии. В целом, суммируя полученные результаты (таблица), можно сделать следующие выводы относительно резистентности на-скальных антарктических микроорганизмов:

(1) летальная доза УФ ($LD_{99,99}$) для бактерий варьировала в пределах 200–480 Дж/м², для дрожжей 700–1200 Дж/м²;

(2) доза УФ LD_{90} составляла, соответственно, для бактерий – 30–105 Дж/м² и для дрожжей 130–240 Дж/м²;

(3) резистентными к УФ радиации были как пигментированные, так и непигментированные (например, штамм 190n2) микроорганизмы;

(4) как правило, грамположительные бактерии были более устойчивы к УФ, чем грамотрицательные.

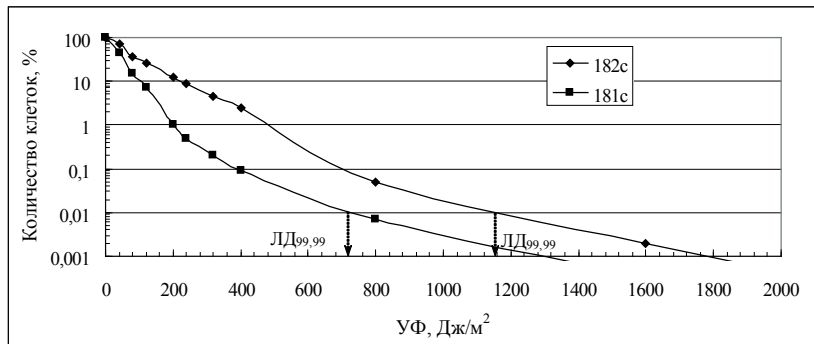


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости антарктических наскальных дрожжей, изолированных из биоплёнок обрастания на скале (o. Galindez), после УФ облучения.

После УФ облучения бактериальных суспензий (доза 400 Дж/м²) на чашках вырастали единичные колонии, устойчивые к УФ (при разведении суспензий от 10⁻² до 10⁻³, в зависимости от штамма). Из этих чашек были отобраны отдельные колонии (клоны) для хранения и последующей проверки у них стабильности такого признака, как устойчивость к УФ. Мы также не исключали, что среди отобранных клонов могли быть мутанты, более устойчивые к УФ, чем родительские штаммы. Всего в эксперименте использовали 12 штаммов бактерий, их описание приведено в таблице. На основании изучения морфолого-культуральных свойств исследованных штаммов установлено, что морфотипы родительских штаммов и их клонов идентичны. Клоны далее пересеивали каждые три месяца (без повторного УФ облучения) на соответствующие среды и хранили при +5°C. Выращивание и хранение осуществляли без доступа света. После хранения этих клонов в лабораторных условиях (в течение года) у них проверили диапазон устойчивости к УФ облучению. Для демонстрации полученных результатов приведены дозовые кривые нескольких наиболее распространённых морфотипов наскальных бактерий (рис. 3).

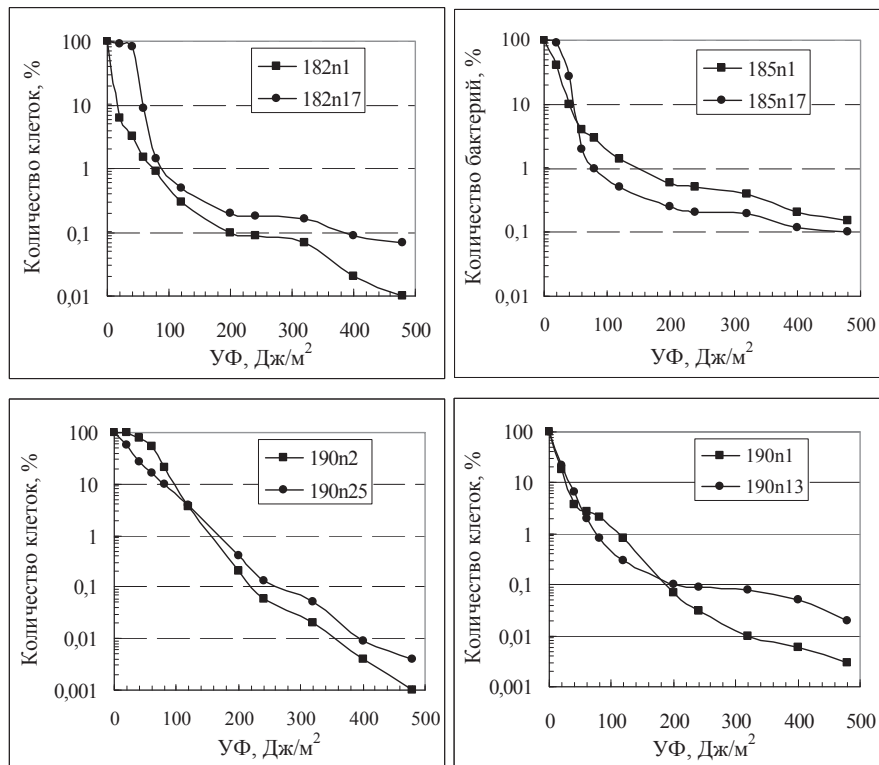


Рис. 3. Устойчивость к УФ родительских штаммов (182n1, 185n1, 190n1, 190n2) и их клонов (182n17, 185n17, 190n13, 190n25), которые были изолированы после первичного УФ облучения (400 Дж/м²) родительских штаммов.

Как следует из представленных данных (рис. 3), родительские штаммы и их клоны, отобранные после УФ облучения (400 Дж/м²) и неоднократно пересевавшиеся в лабораторных условиях, практически не отличались по устойчивости к УФ. Это свидетельствует о генетической стабильности данного признака у исследованных штаммов.

Среди отобранных клонов не обнаружены мутанты, которые отличались бы от родительских штаммов по резистентности к УФ (рис. 3). Мы полагаем, что наскальные антарктические микроорганизмы играют важную роль в стабильности функционирования фитоценозов Антарктики, так как способны выживать в экстремальных условиях высокой УФ радиации. Их можно сравнить с радиоустойчивыми бактериями *Deinococcus radiophilus*, изолированными из выветренного гранита в Антарктике [8], т.е. из экстремально сухих образцов окружающей среды, которые подвергались воздействию солнечного ультрафиолета.

Т.о., определены пороговые и летальные дозы УФ для монокультур антарктических микроорганизмов, изолированных из образцов вертикальной скалы, покрытой мощной биоплёнкой обрастания. Резистентными к УФ радиации были как пигментированные, так и непигментированные бактерии. Как правило, грамположительные бактерии были более устойчивы к УФ, чем грамотрицательные. Показано, что резистентность к УФ радиации у исследованных наскальных микроорганизмов является генетически стабильным признаком. Это подтверждает ранее высказанное предположение, что к экстремальным условиям Антарктики приспособляются те микроорганизмы, которые способны реализовать определённую стратегию выживания, в данном случае у них функционируют механизмы защиты от высокого уровня УФ радиации.

**В.О. Романовська¹, О.Б. Таширев², С.О. Шилін¹, Н.А. Чорна¹,
П.В. Рокитко¹, А.С. Левішко¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
²Національний антарктичний науковий центр МОН України

СТІЙКІСТЬ АНТАРКТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО УФ РАДІАЦІЇ

Резюме

З біоплівки обрастання 11-ти стаціонарних пунктів моніторингу на вертикальній скелі біогеографічного полігону (Українська антарктична станція Академік Вернадський, острів Galindez, Антарктика) ізолювано мікроорганізми, які домінують у цих зразках. Вони представлені морфологічно різноманітними формами бактерій ($n \times 10^7$ клітин в 1г зразку), дріжджами ($n \times 10^5$) та грибами ($n \times 10^4 - 10^6$). Визначено порогові і летальні дози УФ для ізолюваних монокультур антарктичних мікроорганізмів. Порогова доза УФ радіації, яка є мірою здатності клітини до репарації пошкоджень ДНК, для бактерій складала 40–70 Дж/м². Летальна доза УФ (LD_{99,99}) для бактерій варіювала в межах 200–480 Дж/м², для дріжджів 700–1200 Дж/м². Резистентними до УФ радіації були як пігментовані, так і непігментовані бактерії. Як правило, грампозитивні бактерії були стійкіші до УФ, ніж грамнегативні. Показано, що резистентність до УФ радіації у досліджених антарктичних наскальних мікроорганізмів є генетично стабільною ознакою.

Ключові слова: Екстремофільні мікроорганізми, Антарктика, УФ радіація.

**V.A.Romanovskaya, A.B.Tashirev, S.O.Shilin, N.A.Chernaya,
P.V.Rokitko, A.S.Levishko**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
National Antarctic Scientific Center of Ukraine, Ministry of
Education and Science of Ukraine, Kyiv

RESISTANCE OF ANTARCTIC MICROORGANISMS TO UV RADIATION

Summary

The paper deals with the samples of microorganisms isolated from biofilms of encrustation of 11 stationary points of monitoring on the vertical rock of biogeographical testing ground (island Galindez, Antarctic Region). They are presented by morphologically various forms of bacteria ($n \times 10^7$ cells in 1g of sample), yeast ($n \times 10^5$) and fungi ($n \times 10^4 - 10^6$). Threshold and lethal UV dozes for isolated monocultures of the Antarctic microorganisms are determined. The threshold doze of UV radiation which is a measure of ability of a cell to reparation of DNA damages for bacteria was 40-70 J/m². The lethal UV doze (LD_{99,99}) for bacteria varied within the limits of 200-

480 J/m², for yeast of 700-1200 J/m². Both pigmented and not pigmented bacteria were resistant to UV radiation. As a rule, Gram-positive bacteria were more resistant to UV than Gram-negative ones. It is shown, that resistance of investigated Antarctic rocky microorganisms to UV radiation is their genetically stable characteristic.

The paper is presented in Russian.

Key words: Extremophilic microorganisms, Antarctic Region, UV radiation.

The authors' address: Romanovskaya V.O., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Назим А., Джеймс А. Жизнь в условиях интенсивного облучения. – В кн.: Жизнь микробов в экстремальных условиях. / Под ред. Д. Кашнера. – Москва: Мир, 1981. – С. 472–504.
2. Романовская В.А., Рокитко П.В., Малащенко Ю.Р., Черная Н.А. Чувствительность к стрессовым факторам почвенных бактерий, изолированных из зоны отчуждения ЧАЭС // 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 резистентность к ультрафиолетовому и ионизирующему излучению // Микробиология. 1998. – **67**, № 1. – С. 106–115.
4. 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.
5. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики // Микробиол. журнал. – 2010. – **72**, № 3. – С. 8–13.
6. Самойлова К.А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. – Ленинград: Наука, 1967. – 146 с.
7. Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных. – Москва: Высшая школа, 1984. – 375 с.
8. Counsell T., Murray R. G. E.. Polar lipid profiles of the genus *Deinococcus* // Intern. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – **36**, N 2. – P. 202–206.
9. Dose K, Klein A. Response of *Bacillus subtilis* spores to dehydration and UV irradiation at extremely low temperatures // Orig. Life Evol. Biosph. – 1996. – **26**, N 1. – P. 47–59.
10. Moseley B.E.B. The isolation and some properties of radiation-sensitive mutants of *Micrococcus radiodurans* // J. Gen. Microbiol. – 1967. – **49**, N 2. – P. 203–300.

Отримано 15.09.2010