

УДК 579.26

АУТЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЯ И СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹Романовская В.А., ²Парфенова В.В., ^{2,3}Белькова Н.Л.,

²Суханова Е.В., ¹Гладка Г.В., ¹Таширев А.Б.

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, e-mail: victoriaroman@ukr.net;

²ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН, Иркутск, e-mail: nlbelkova@gmail.com;

³Иркутский государственный университет, Иркутск

Изучение аутоэкологии бактерий и дрожжей, изолированных из почв и фитоценозов Антарктики, показало, что большинство из них являются психротолерантными, умеренными галофилами и устойчивыми к УФ. Штамм *Serratia* sp. 6r1g был единственным штаммом, высоко чувствительным к УФ. Изолированные бактерии и дрожжи таксономически разнообразны, идентифицированы по рибосомной филогении и относятся к видам *Micrococcus luteus*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Sporosarcina aquimarina*, *Rhodococcus fascians*, *Staphylococcus* sp., *Fronidihabitans* spp., *Arthrobacter* sp., *Serratia* sp., *Rhodotorula* spp., *Leucosporidium* sp., *Rhodosporidium* sp., *Tremella* sp., *Chaetothyriales* spp. и *Debaryomyces* sp. Видимо, стратегия выживания микробных сообществ в Антарктике направлена на естественную селекцию психро- и галотолерантных, а также УФ-резистентных микроорганизмов, что является их природной реакцией на экстремальные условия: низкую температуру, высокий уровень солнечной радиации и повышенную минерализацию в прибрежных зонах.

Ключевые слова: Антарктика, микроорганизмы, таксономическое разнообразие, аутоэкология, устойчивость к УФ, психро- и галотолерантность

AUTECOLOGY, TAXONOMY, AND STRATEGY OF SURVIVING IN EXTREME CONDITION FOR ANTARCTIC MICROORGANISMS

¹Romanovskaya V.A., ²Parfenova V.V., ^{2,3}Belkova N.L., ²Sukhanova E.V.,

¹Gladka G.V., ¹Tashirev A.B.

¹Institute of microbiology and virology NAS Ukraine, Kyiv, e-mail: victoriaroman@ukr.net;

²Limnological Institute SD RAS, Irkutsk, Russia, e-mail: nlbelkova@gmail.com;

³Irkutsk state university, Irkutsk

Investigation of autecology of bacteria and yeast isolated from soil and phytocenosis of Antarctica showed that most of microorganisms are psychrotolerance, moderate halophilic and resistance to UV. The only strain sensitive to UV was *Serratia* sp. 6r1g. Isolated bacteria and fungi was taxonomic diverse, identified by ribosomal phylogeny and belonged to *Micrococcus luteus*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Sporosarcina aquimarina*, *Rhodococcus fascians*, *Staphylococcus* sp., *Fronidihabitans* spp., *Arthrobacter* sp., *Serratia* sp., *Rhodotorula* spp., *Leucosporidium* sp., *Rhodosporidium* sp., *Tremella* sp., *Chaetothyriales* spp., and *Debaryomyces* sp. It seems that strategy to survive for microbial communities in Antarctica focused on natural selection of psychro and halo tolerant, as well as resistance to UV microorganisms, and it has been their indigenous reaction on extreme condition: low temperature, high level of solar radiation, and increased mineralization in littoral zone.

Keywords: Antarctica, microorganisms, taxonomic diversity, autecology, resistance to UV, psychro and halotolerance

Среди всех природных стрессов на нашей планете холод является наиболее распространённым. Так, 90% воды в Мировом океане имеет температуру от 5°C и ниже, а в наземных экосистемах около 80% составляют места обитания, где низкие температуры сохраняются длительный период: это Аляска (85%), Россия и Канада (по 55%), Китай (20%) и большая часть Антарктиды. Ранее нами из наземных экосистем Западной Антарктики и прилегающих к ней островов Аргентинского архипелага выделены аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы, в том числе чёрные и красные дрожжи [5, 7]. Впервые чёрные и красные дрожжи были найдены академиком Б.Л. Исаченко ещё 100 лет назад в Аркти-

ке, т.е. на другом полярном континенте [4]. Учитывая экстремальные условия Антарктики (низкую температуру, высокий уровень солнечной радиации и повышенную минерализацию в прибрежных экосистемах региона), мы предположили, что микроорганизмы данного региона должны быть резистентны к этим факторам, что и определило цель наших исследований, а также необходимость рассмотрения стратегии их выживания в экстремальных условиях.

Материал и методы исследования

Объектами исследования служили аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы, изолированные ранее при 1–5°C [5] и 30°C [7] из различных экосистем Антарктики (почва, фитоценозы, биоплёнка обрастания) (табл. 1).

Таблица 1

Список исследованных в работе микроорганизмов, изолированных из наземных экосистем западной Антарктики

Номера штаммов	Температура при изоляции штаммов из образцов	Характеристика образцов*, откуда были изолированы штаммы
O-1, O-3, S06, S10	30°C	Орнитогенная почва
S33	30°C	Почва под мхом, остров Lippmann
S36	30°C	Орнитогенная каменистая почва, остров Iizar
S237	30°C	Почва глинистая, мыс Rassmussen (западная Антарктида)
O-7, O-10, 181n3	30°C	Чёрный лишайник на южной стороне вертикальной скалы
S182	30°C	Чёрный накипной лишайник на вертикальной скале
40r5g	5°C	Зелёный лишайник на камнях
4r5, 5r5	5°C	Трава <i>Decshampcia antarctica</i> на почве между камней
S14	30°C	Мох на дне высохшего озера, остров Three little pig
S11, S12	5°C	Тёмно-зелёный мох
6r1g	1°C	Зелёный мох, отобранный на моховом поле
S48	30°C	Мох, отобранный на мысе Tuxen (западная Антарктида)
28r5g	5°C	Биоплёнка обрастания на вершине вертикальной скалы

Примечание. * – штаммы изолированы из образцов, отобранных на острове Galindez, если не указано иначе.

Для культивирования бактерий использовали среду Nutrient Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) и глюкозо-картофельную агаризованную среду. Дрожжи выращивали на солодовом агаризованном сусле. Все микроорганизмы культивировали при 18–20°C.

Выделение геномной ДНК проводили из клеточных суспензий микроорганизмов, зафиксированных 70% этанолом. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью коммерческого набора ДНК-сорб по прилагаемым к наборам инструкциям производителя с небольшими модификациями (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) [1].

Аmplификацию препаратов ДНК изолированных культур бактерий проводили с коммерческим набором N-Taq (НТИ-Байкал, Иркутск) с консервативными бактериальными праймерами 27L (5'–3': AGAGTTTGATCATGGCTCAG) и 1542R (5'–3': САКАААGGAGGTGATCC) [2], дрожжей NS3 (5'–3': GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC) и NS6 (5'–3': GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC) [8]. Использовали следующий режим реакции: в первом цикле денатурация при 95°C – 5 мин, затем 30 циклов: денатурация 94°C – 30 с, отжиг 52°C – 30 с и элонгация 72°C – 90 с, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 7 мин. Амплификацию проводили в термоциклере Бис (БИС-Н, Россия). Дальнейший анализ ампликонов и подготовку к секвенсной реакции вели по разработанным ранее методикам [2]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Очистка и секвенирование ПЦР продуктов рДНК штаммов O-1, O-3, O-7, O-10 были выполнены Macrogen Inc. (Южная Корея).

Филогенетический анализ. Полученные последовательности генов 16S рНК бактериальных изолятов сравнивали с таковыми микроорганизмов, депонированных в базе данных GenBank, используя пакет

программы BLAST. Филогенетическое положение определяли построением дендрограмм, показывающих положение изучаемого штамма среди близкородственных и типовых видов (пакеты программ ClustalX 2.1, Mega v. 6.00) с использованием метода ближайших соседей.

Аутэкологию, т.е. влияние экстремальных факторов на выживаемость микроорганизмов изучали у антарктических бактерий и дрожжей, изолированных из наземных экосистем (табл. 1). Устойчивость к ультрафиолетовому излучению определяли, как описано ранее [6]. Для количественной оценки данного показателя вычисляли летальные дозы УФ (ЛД₅₀ и ЛД_{99,99}). Психро- и галотолерантность микроорганизмов определяли стандартными методами в диапазонах 1–40°C и 0,1–200 г NaCl/л соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение

У изолятов из фитоценозов и орнитогенной почвы Антарктики изучены психро- и галотолерантность, а также УФ-резистентность. Для сопоставления особенностей аутэкологии и видового состава бактерий проведена молекулярно-генетическая идентификация чистых культур (табл. 2). Филогенетический анализ позволил определить преимущественно представителей грамположительных бактерий двух крупных фил Firmicutes и Actinobacteria: *Micrococcus luteus*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Sporosarcina aquimarina*, *Staphylococcus* sp., *Rhodococcus fascians*, *Fronidhabitans* spp. и *Arthrobacter* sp. Грамотрицательные бактерии представлены только *Serratia* sp., которая

относится к классу Gammaproteobacteria. Дрожжи представлены 4 родами базидиомицетов (*Rhodotorula* spp., *Tremella* sp., *Rhodospiridium* sp. и *Leucosporidium* sp.) и 2 – аскомицетов (*Chaetothyriales* spp. и *Debaryomyces* sp.).

Таблица 2

Экофизиологические свойства исследованных микроорганизмов

Номера штамма	Вид или род	Летальные дозы УФ, Дж/м ²		Диапазон роста	
		ЛД ₉₀	ЛД _{99,99}	NaCl, %	T, °C
Бактерии					
O-1	<i>Micrococcus luteus</i>	70	220	0,1–10	5–30
O-3	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	45	165	0,1–5	1–42
O-7	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	80	540	0,1–2	1–30
O-10	<i>Staphylococcus</i> sp.	40	310	0,1–2	10–30
181n3	<i>Rhodococcus fascians</i>	80	280	0,1–5	1–30
4r5	<i>Frondehabitans</i> sp.	70	105	0,1–5	1–20
5r5	<i>Frondehabitans</i> sp.	80	140	0,1–2	1–30
6r1g	<i>Serratia</i> sp.	40	75	0,1–5	1–30
28r5g	<i>Arthrobacter</i> sp.	75	240	0,1–5	1–30
40r5	<i>Frondehabitans</i> sp.	65	120	0,1–2	1–30
Дрожжи					
S06	<i>Tremella</i> sp.	350	1300	0,1–10	1–30
S10	<i>Chaetothyriales</i> sp.	200	1600	0,1–15	5–30
S11	<i>Leucosporidium</i> sp.	75	300	0,1–10	1–30
S12	<i>Debaryomyces</i> sp.	75	230	0,1–10	1–30
S14	<i>Rhodospiridium</i> sp.	200	1400	0,1–10	1–37
S33	<i>Rhodotorula</i> sp.	280	1400	0,1–10	1–37
S36	<i>Chaetothyriales</i> sp.	150	650	0,1–10	5–30
S48	<i>Rhodotorula</i> sp.	250	800	0,1–10	1–37
S182	<i>Rhodotorula</i> sp.	280	1150	0,1–15	1–37
S237	<i>Chaetothyriales</i> sp.	120	650	0,1–15	5–30

Влияние УФ радиации. Разрушение озонового слоя над Антарктикой обуславливает высокий уровень солнечного излучения в регионе. Исследование устойчивости к УФ антарктических микроорганизмов выявило высокий уровень их резистентности (рис. 1, 2). Для большинства бактерий пороговая доза УФ, которая определяется размером «плеча» на дозовой кривой, составляла 40 Дж/м². Этот показатель резистентности к УФ означает дозу облучения, до которой повреждения ДНК могут полностью репарироваться. Очевидно, что чем выше пороговая доза облучения, тем, соответственно, выше способность микроорганизмов к выживанию в экстремальных условиях повышенного УФ излучения.

Из числа исследованных бактерий наиболее устойчивы к УФ *Sporosarcina aquimarina* O-7 и *Staphylococcus* sp. O-10 (рис. 1), у которых ЛД_{99,99} составляла соответственно 540 и 310 Дж/м² (табл. 2). Наи-

более чувствителен штамм 6r1g, который близок роду *Serratia* (рис. 1). Пигментированные штаммы дрожжей были высоко резистентны к УФ (рис. 2). ЛД_{99,99} УФ для них варьировала в пределах 650–1600 Дж/м² (табл. 2). Возможно, пигменты минимизировали клеточные повреждения у дрожжей при УФ облучении. Следует отметить, что уровень устойчивости микроорганизмов к УФ сохранился после пяти лет их хранения в лабораторных условиях (при периодических пересевах четыре раза в год), что свидетельствует о генетической стабильности данного признака.

Психро- и галотолерантность. Независимо от температуры (1–5 или 30 °C) при первичной изоляции штаммов из природных источников (табл. 1), все исследованные антарктические бактерии и дрожжи способны расти как при низкой (1–5 °C), так и умеренной (18–30 °C) температуре, т.е. они являются психротолерантными (табл. 2). Следовательно, антарктические

штаммы способны расти в температурном диапазоне, характерном для Антарктики (1–5°C), а также в ко-

роткий летний период, когда температура достигает 20°C и выше, особенно на южной стороне скал.

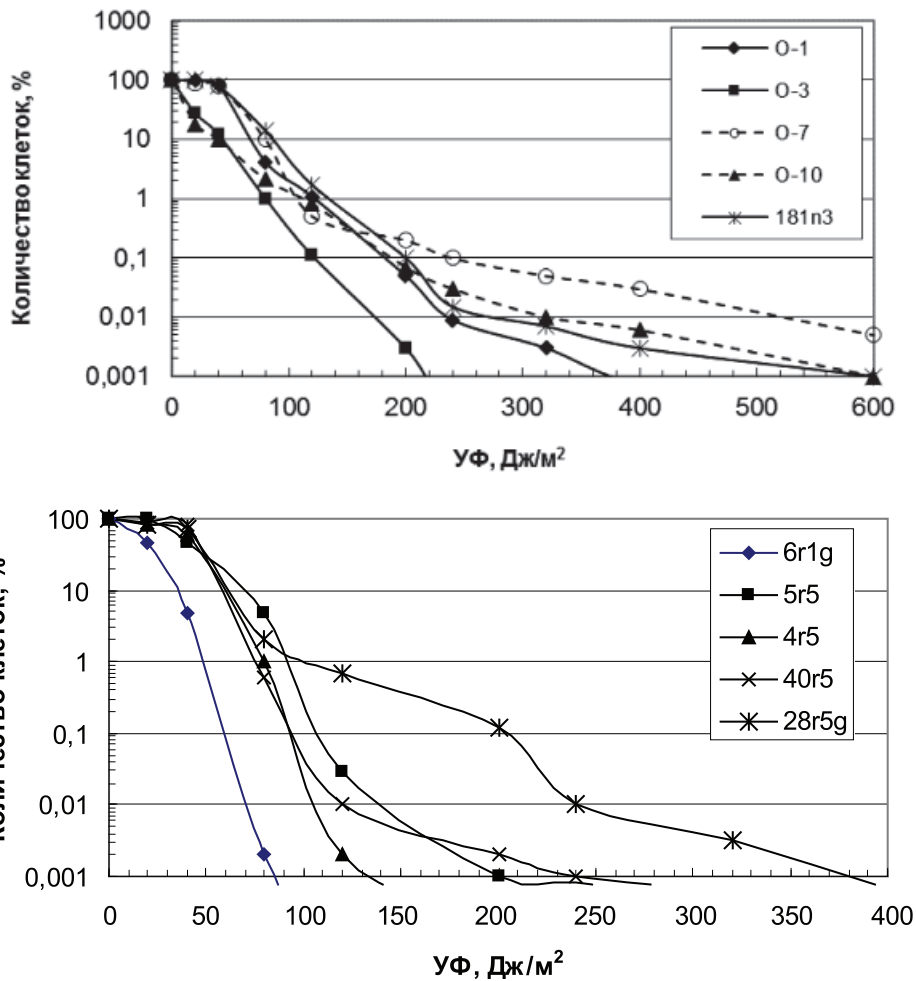


Рис. 1. Зависимость выживаемости антарктических бактерий от доз УФ облучения

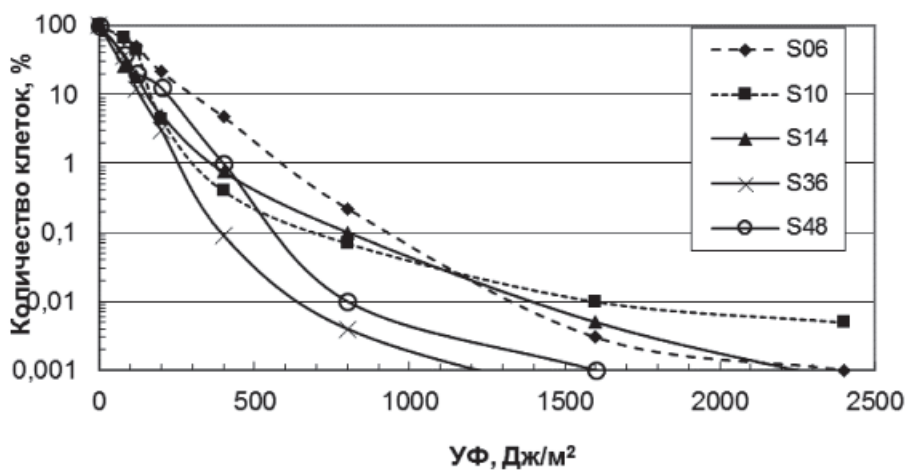


Рис. 2. Зависимость выживаемости антарктических дрожжей от доз УФ облучения. Обозначения на рисунках соответствуют номерам проанализированных штаммов

Проведенные нами эксперименты показали, что исследованные антарктические бактерии были умеренно галофильными (рост в среде, содержащей 2–5% NaCl). Наиболее устойчивыми к NaCl были отдельные представители родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Frondehabitans* и *Serratia* (рост при содержании 5% NaCl в среде) (табл. 2). Все исследованные антарктические дрожжи росли в диапазоне NaCl в среде 0,1–10% (табл. 2). Можно предположить, что формирование наземных микробиоценозов в Антарктике находится под влиянием Мирового океана, т.к. в прибрежной зоне континента и на островах во время регулярных штормов происходит постоянное орошение наземных ценозов морской водой с высокой минерализацией.

Стратегия выживания микроорганизмов в экстремальных условиях Антарктики, в частности при высоком уровне солнечного излучения, может обеспечиваться несколькими способами: как механизмами, которые минимизируют клеточные повреждения, так и системами репарации, которые устраняют повреждения ДНК. Минимизация повреждений у чёрных (*Chaetothyriales* spp.) и красных (*Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium* sp.) дрожжей может происходить за счёт пигментов (соответственно, меланинов и каротиноидов). Непигментированные дрожжи (*Leucosporidium* sp. S11 и *Debaryomyces* sp. S12) были менее устойчивы к УФ радиации (табл. 2). При отсутствии пигментов микроорганизмы реализуют другие системы защиты. Так, для устранения повреждений ДНК, которые возникают при различных типах радиации, в том числе и при солнечном коротковолновом УФ излучении (независимо от наличия пигментов или их отсутствия), наиболее важным является функционирование у клеток эффективных систем репарации повреждений ДНК. Такое направление стратегии выживания используют экстремально радиорезистентные бактерии [9]. Как нами показано, антарктические микроорганизмы высоко устойчивы к УФ (рис. 1, 2), что, вероятно, обусловлено наличием активных систем репарации повреждений ДНК, о чём свидетельствуют высокие летальные дозы УФ радиации, которые являются мерой способности клеток к репарации повреждений ДНК.

Психрофилия микроорганизмов обеспечивается сложными метаболическими системами, в частности особенностями их ферментных белков и мембранных липидов. Увеличение у последних содержания ненасыщенных жирных кислот позволяет мембранам находиться в функционально

активном жидкостно-кристаллическом состоянии при низких температурах. Способность к психрофилии определяется также синтезом в клетках значительного количества ключевых ферментов, что позволяет клетке активно функционировать даже при низкой температуре [3].

Маловероятно, что такие метаболически сложные механизмы, как УФ-резистентность и психротолерантность микроорганизмов, могли сформироваться как адаптивная реакция на действие абиотических стрессовых факторов, характерных для Антарктики. Особенно если принять во внимание аэрозольный, орнитогенный и антропогенный трансконтинентальный перенос микрофлоры в экосистемы Антарктики. Видимо, в условиях низких температур и высокого уровня УФ радиации преимущество для выживания в Антарктике получили микроорганизмы, которые изначально были способны расти при низкой температуре (1–5 °С) и которые имели эффективные механизмы репарации клеточных повреждений (в частности, повреждений ДНК), и/или пигменты (каротиноиды и меланины).

Заключение

Стратегия выживания микробных сообществ в Антарктике направлена на естественную селекцию психро- и галотолерантных, а также УФ-резистентных микроорганизмов, что является их природной реакцией на экстремальные условия Антарктики: низкую температуру, высокий уровень солнечной радиации и повышенную минерализацию в прибрежных зонах. Представленные данные позволяют предположить, что первопричиной формирования и эволюции микробных сообществ в Антарктике послужили низкая температура, высокий уровень УФ, а также географическая изоляция островов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 14-04-90416-а-Укр и НАН Украины, договор № 02-04-14 (У).

Список литературы

1. Белькова Н.Л., Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Ханаева Т.А. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами // Биология внутренних вод – 2008. – № 2. – С. 91–94.
2. Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // В кн. Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Под ред. Андреевой А.М. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – С. 53–63.
3. Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. – Санкт-Петербург: Изд. С.-Петербургского университета, 2007. – 299 с.
4. Исаченко Б.Л. Исследования надъ бактериями Северного Ледовитого Океана. – Петроград: Типография В.О. Киршбаума, 1914. – 297 с.

5. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Гладка Г.В. Распространение психрофильных микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики // *Микробиол. журнал.* – 2012. – 74, № 1. – С. 3–8.

6. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А., Рокитко П.В., Левишко А.С. Устойчивость к УФ радиации антарктических микроорганизмов // *Микробиол. журнал.* – 2011. – 73, № 3. – С. 3–8.

7. Таширев 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. 4–11.

8. Anderson I.C., Cairney J.W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques // *Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 6, No. 8. – P. 769–779.

9. Daly M.J., Minton K.W. Resistance to radiation // *Science.* – 1995. – Vol. 270, № 24. – P. 1318.

5. Romanovskaja V.A., Tashirev A.B., Shilin S.O., Gladka G.V. Rasprostranenie psikhrofil'nykh mikroorganizmov v nazemnykh biotopakh Antarktiki, *Mikrobiol. zhurnal.* 2012; 74 (1): 3–8.

6. Romanovskaja V.A., Tashirev A.B., Shilin S.O., Chernaja N.A., Rokitko P.V., Levishko A.S. Ustoychivost' k UF radiacii antarkticheskikh mikroorganizmov, *Mikrobiol. zhurnal.* 2011; 73 (3): 3–8.

7. Tashirev A.B., Romanovskaja V.A., Rokitko P.V., Shilin S.O., Chernaja N.A., Tashireva A.A. Mikrobiologicheskij analiz nazemnykh biotopov Antarktiki, *Mikrobiol. zhurnal.* 2010; 72 (2): 4–11.

8. Anderson I.C., Cairney J.W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques, *Environ. Microbiol.* 2004; 6 (8): 769–79.

9. Daly M.J., Minton K.W. Resistance to radiation, *Science.* 1995; 270 (24): 1318.

References

1. Belkova N.L., Dzijuba E.V., Sukhanova E.V., Khanaeva T.A. Adaptacia metodov molekularno-geneticheskogo analiza dlja izuchenija mikroorganizmov, associirovannykh s rybami, *Biologija vnutrennikh vod.* 2008; 2: 91–4.

2. Belkova N.L. Molekuljarno-geneticheskie metody analiza mikrobnykh soobshchestv. V kn. Raznoobrazie mikrobnykh soobshchestv vnutrennikh vodoemov Rossii: Uchebno-metodicheskoe posobie. Pod red. Andreevoy A.M. Jaroslavl': Izd-vo ООО «Printkhaus», 2009. 53–63.

3. Ermilova E.V. Molekuljarnye aspekty adaptacii prokariot. Sankt-Peterburg: Izd. S.-Peterburgskogo universiteta, 2007. 299.

4. Isachenko B.L. Izsledovanija nad bakterijami Severnago Ledovitago Okeana. Petrograd: Tipografija V.O. Kirshbauma, 1914. 297.

Рецензенты:

Беликов С.И., д.б.н., профессор, зав. лабораторией аналитической биоорганической химии, ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения РАН, г. Иркутск;

Иутинская Г.А., д.б.н., профессор, зав. отделом общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, г. Киев.

Работа поступила в редакцию 18.11.2014