

УДК 579.26

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В НАЗЕМНЫХ БИОТОПАХ АНТАРКТИКИ

Романовская В.А., Таширев А.Б., Рокитко П.В., Шилин С.О.,
Чёрная Н.А., Таширева А. А.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Д 03680, Київ ГСП, вул. Заболотного, 154. E-mail: victoriaroman@ukr.net

Реферат. Установлено, что общее количество хемоорганотрофных аэробных микроорганизмов в почве и иле водоёмов, на траве, мхах и лишайниках на островах Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, Three little pigs, King-Georg составляло 10^5 – 10^8 клеток/г образца, что меньше на 2-3 порядка, чем в регионах с умеренным климатом. Во мхах, лишайниках, траве и почве выявлены метилотрофные бактерии (10^2 – 10^4 клеток/г образца). Показано, что в антарктических лишайниках частота встречаемости угольно-чёрных и красных дрожжей, а также их общее количество значительно выше (10^2 – 10^4 клеток/г образца), чем в других антарктических биотопах. Из антарктических дрожжей *Exophiala nigra* выделены угольно-чёрные пигменты. По комплексу специфических химических тестов, УФ-спектрам и другим свойствам эти пигменты идентичны меланину. Впервые показано наличие бактерий и дрожжей, резистентных к высоким дозам УФ излучения, в биоплёнках на вертикальных скалах Антарктики. Летальная доза УФ облучения для антарктических розовых штаммов *Methylobacterium* превышала 200–250 Дж/м², для угольно-чёрных дрожжей – 500–800 Дж/м², для красных дрожжей – 1200–1500 Дж/м². В целом в антарктических образцах обнаружены представители нескольких филогенетических линий микроорганизмов: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, а также дрожжи. Полученные результаты указывают на таксономическое разнообразие микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики.

Ключевые слова: Антарктика, антарктические микроорганизмы, антарктические дрожжи, УФ облучение.

Реферат. Показано, що кількість хемоорганотрофних мікроорганізмів у ґрунті й мулі, на траві, мхах та лишайниках на островах Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, Three little pigs, King-Georg складала 10^5 – 10^8 клітин/г зразку, що менше на 2-3 порядки, ніж у регіонах з помірним кліматом. У мхах, лишайниках, траві й ґрунті виявлено метилотрофні бактерії (10^2 – 10^4 клітин/г зразку). В антарктичних лишайниках частота зустрічності вугільно-чорних і червоних дріжджів а також їх загальна кількість значно вищі (10^2 – 10^4 клітин/г зразку), ніж у інших антарктичних біотопах. Із клітин *Exophiala nigra* виділено вугільно-чорні пігменти. За комплексом специфічних хімічних тестів, УФ-спектрам та за іншими властивостями ці пігменти ідентичні меланіну. Вперше виявлено бактерії і дріжджі, резистентні до високих доз УФ опромінення, в біоплівках на вертикальних скелях Антарктики. Летальна доза УФ опромінення для антарктичних рожевих штамів *Methylobacterium* перевищувала 200–250 Дж/м², для вугільно-чорних дріжджів – 500–800 Дж/м², для червоних дріжджів – 1200–1500 Дж/м². У цілому в антарктичних зразках знайдено представників кількох філогенетичних ліній мікроорганізмів: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, а також дріжджі.

Ключові слова: Антарктика, антарктичні мікроорганізми, антарктичні дріжджі, УФ-опромінення.

1. Введение

Географическая изолированность островов Антарктики, озоновая дыра, из-за которой в районе Антарктиды высок уровень УФ излучения, а также низкая температура сформировали в Антарктике особый микромир. Несмотря на обилие публикаций о микроорганизмах в Антарктике, они не позволяют в полной мере оценить микробное разнообразие в этой

уникальной географической зоне, в частности, в её наземных биотопах. Поэтому цель нашей работы – оценить разнообразие хемоорганотрофных аэробных микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики.

2. Методы

Образцы для микробиологических исследований отбирали стандартными методами в наземных биотопах Антарктики. Микроорганизмы выделяли из нативных (хранение при +5°C, 10 сут.) и замороженных (хранение при –20°C, 30 сут.) образцов. Количество микроорганизмов в образцах определяли путём посева последовательных десятикратных разведений образцов на среды: NA – «Nutrient Agar» (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.), CA – сусло агар и минеральную среду MM (Романовская и др., 1996) с метанолом (0,5 об.%). Чистые культуры изолировали общепринятыми методами. Идентификацию микроорганизмов до рода проводили на основании изучения их морфолого-культуральных и некоторых физиологических свойств методами, приведенными в руководстве (Методы общей бактериологии, 1983), а также используя сиквентс-анализ генов 16S рРНК, как описано нами ранее (Романовская и др., 2004). Выделение микробных меланинов из клеточной биомассы проводили путем щелочной экстракции (Рубан и др., 1969). Спектры пигментов определяли на Specord UV VIS. Выживаемость микроорганизмов после различных доз УФ облучения (а также летальную дозу УФ) определяли, как описано нами ранее (Романовская и др., 1999).

3. Результаты

Проведен микробиологический анализ 120-ти образцов наземных биотопов (почва, трава, мхи, лишайники и ил водоёмов) западного побережья Антарктического полуострова (мыс Rasmussen, мыс Tuxen, гора Waugh), островов Аргентинского архипелага, а также некоторых других островов (Galindez, Skua, Corner, Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, Three little pigs, King-Georg) (рис.1).

3.1. Таксономическое разнообразие микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики

Установлено, что общее количество хемоорганотрофных аэробных микроорганизмов составляло 10^5 – 10^8 клеток/г образца, что меньше на 2-3 порядка, чем в регионах с умеренным климатом. Наблюдалась тенденция уменьшения количества хемоорганотрофных микроорганизмов в антарктических биотопах в таком порядке (клеток/г образца): почва (1×10^7 – 8×10^8), трава *Deschampsia antarctica* (10^6 – 10^8), подземная часть мха (1×10^6 – 5×10^7), ил пресного водоёма (10^5 – 10^7), наземная часть мха (10^3 – 10^6), лишайники (10^3 – 10^6). На основании изучения диагностических свойств показано, что некоторые антарктические микроорганизмы можно отнести к родам *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*. Т.о., в антарктических образцах были обнаружены представители нескольких филогенетических линий: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*.

В целом полученные результаты свидетельствуют о таксономическом разнообразии микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики. На исследованных островах не обнаружено значительных различий относительно количественного состава микрофлоры. По предварительной оценке, несмотря на географическую изолированность островов Антарктики и специфические климатические условия на них, большинство выделенных нами микроорганизмов относятся к традиционным классическим таксонам, широко распространённым в различных регионах Земли с умеренным климатом.



Рис. 1. Карта-схема западного побережья Антарктиды с прилегающими островами. В левом верхнем углу показана часть островов Аргентинского архипелага, увеличенных в несколько раз. Кругами показаны места отбора образцов.

3.2. Распространение метилотрофных бактерий в наземных биотопах Антарктики

Практически сведения о существовании в Антарктике метилотрофных бактерий (метилотрофов), которые способны использовать метанол в качестве единственного источника углерода и энергии, отсутствуют. Поэтому мы изучали их распространение в данном регионе. Из образцов мха, лишайника, травы и почвы в Тихоокеанском секторе Антарктики выделены метилотрофы. Их количество составляло $10^2 - 10^4$ клеток/г образца.

Штаммы *Methylobacterium* чаще встречаются на мхах, траве *Deschampsia antarctica* и лишайниках, чем в почве и иле озер (табл. 1). Некоторые острова Антарктики сопоставимы по количеству клеток *Methylobacterium* с регионами умеренного климата.

Таблица 1

Количество образцов из биотопов Антарктики, в которых были выявлены метилотрофные бактерии рода *Methylobacterium* (в % от количества изученных образцов определённого биотопа)

Биотоп	Количество образцов		
	исследованных	в которых выявлены метилотрофы	
		количество	% от количества
Мох	25	22	88
Лишайник	15	10	66
Трава	10	8	80
Почва под растениями	8	7	87
Почва без растений	12	2	16
Ил	10	3	30

На основании комплекса диагностических признаков изолированные розовоокрашенные штаммы, факультативно использующие метанол и реализующие сериновый цикл ассимиляции одноуглеродных соединений, отнесены к роду *Methylobacterium*.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК антарктических метиловобактерий с таковыми других бактерий в базе данных GenBank показал высокий уровень сходства с видом *Methylobacterium extorquens* (99.4–99.7%).

Утилизация метанола метиловобактериями в экосистемах Антарктики, несомненно, имеет важное экологическое значение, т. к. предохраняет атмосферу от загрязнения этим токсичным соединением. Более того, как нами было показано, эпифитные и почвенные штаммы *Methylobacterium* способны снижать температуру замерзания воды, т.е. в природных условиях они влияют на процесс кристаллизации льда. Эти свойства штаммов *Methylobacterium* имеют важное значение для выживаемости биоты в условиях Антарктики.

3.3. Скрининг дрожжей-продуцентов меланина в наземных антарктических биотопах.

В настоящее время считается, что меланин перспективен для применения в медицине и фармакологии. В связи с тем, что ранее в полярных регионах были обнаружены чёрные дрожжи, нами проведен скрининг дрожжей-продуцентов меланина в антарктических биотопах. Тёмнопигментированные микроорганизмы выявлены в 20% исследованных образцов наземных биотопов Антарктики (табл. 2).

Угольно-чёрные дрожжи обнаружены на накипных и кустистых лишайниках на вертикальных скалах, реже встречаются в почве, их количество составляло 1×10^2 ... 6×10^4 клеток /г образца. Эти антарктические дрожжи близки виду *Exophiala nigra* (Issatsch.) Naase et de Hoog 1999. Из биомассы двух штаммов чёрных дрожжей мы экстрагировали угольно-чёрные пигменты. Согласно результатам изучения комплекса специфических химических тестов, УФ-спектров (в области 220–230 нм) и спектров поглощения в видимой области (400–800 нм), эти пигменты идентичны меланину. Выход меланина у одного из штаммов дрожжей составлял более 10% от количества биомассы. То., в наземных биотопах Антарктики выявлены дрожжи, интенсивно синтезирующие меланин.

Таблица 2

Количество антарктических образцов, в которых были выявлены тёмнопигментированные микроорганизмы (в % от количества изученных образцов определённого биотопа)

Биотоп	Количество образцов		
	изученных	в которых выявлены тёмнопигментированные микроорганизмы	
		количество	%
¹ Чёрные лишайники	15	5	33
² Смесь лишайников	10	2	20
³ Лишайники	10	2	20
Мох	10	2	20
Трава <i>Deschampsia antarctica</i>	10	1	10
Почва	10	1	10
Ил	5	0	0

¹ Накипные лишайники на вертикальной скале (о. Galindez).

² Несколько видов лишайников: пушистый нитевидный лишайник, ветвистый или кустистый лишайник на скале (о. Galindez).

³ Разные экологические группы лишайников серого и зелёного цветов, расположенные на мхах и камнях (острова Lippmann, Darboux, Three little pigs).

3.4. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики

Мы предположили, что вертикальные скалы на островах Антарктики, практически всегда открытые для Солнца, должны характеризоваться микроценозами, устойчивыми к УФ излучению. Поэтому мы изучали устойчивость наскальных антарктических микроорганизмов к УФ облучению. Исследование наскальных антарктических образцов показало широкое распространение в них пигментированных микроорганизмов. Частота их встречаемости, 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 (рис. 2–4).

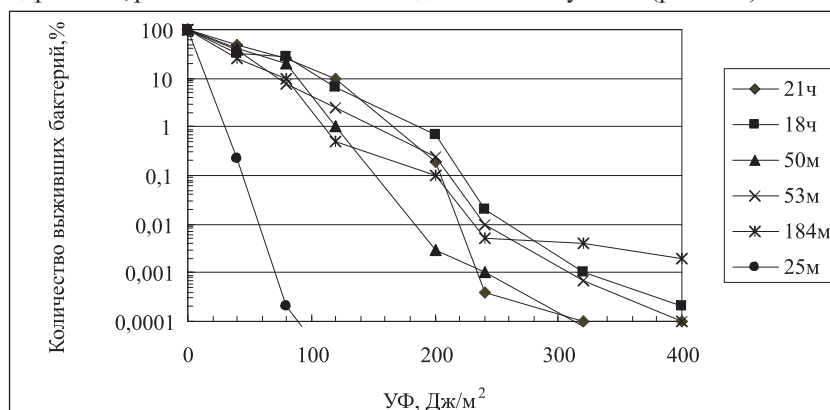


Рис. 2. Выживаемость штаммов *Methylobacterium* при различных дозах УФ облучения.

Для сравнения необходимо отметить, что эти дозы УФ значительно превышают предельно допустимые дозы для многих микроорганизмов.

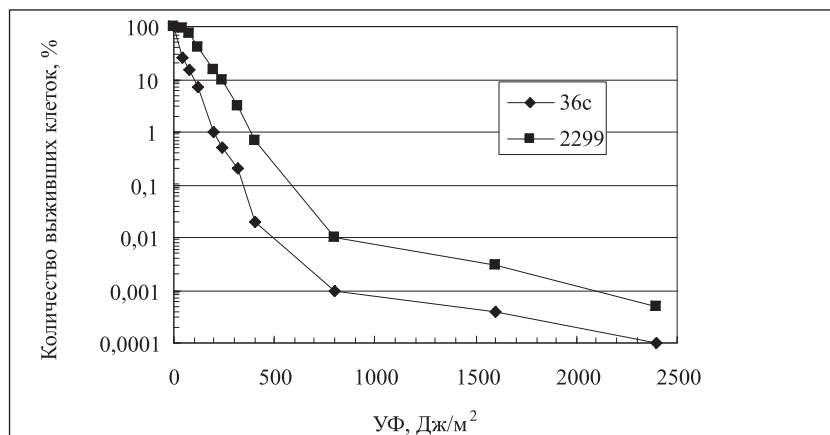


Рис. 3. Выживаемость антарктических угольно-чёрных дрожжей *Exophiala nigra* при различных дозах УФ облучения.

Летальная доза УФ облучения, при которой происходила 99,99 % клеточная гибель, для антарктических розовопигментированных бактерий *Methylobacterium* превышала 200–250 Дж/м² (рис. 2), для угольно-чёрных дрожжей – 500–800 Дж/м² (рис. 3), для красных дрожжей – 1200–1500 Дж/м² (рис. 4).

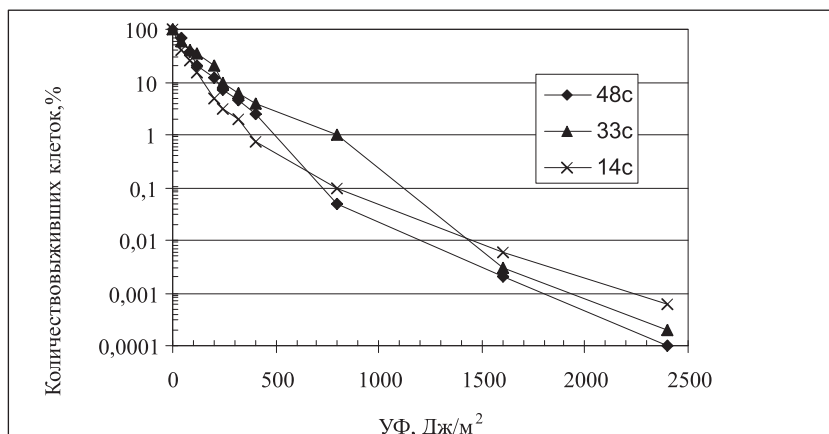


Рис. 4. Дозовые кривые выживаемости антарктических красных дрожжей после УФ облучения.

У штаммов *Methylobacterium*, изолированных из регионов с различным климатом, различий относительно летального эффекта УФ не обнаружено. Возможно, адаптация антарктических микроценозов к экстремальным факторам окружающей среды происходила путём естественного отбора (селекции) из наскальных микроценозов тех микроорганизмов, у которых устойчивость к этим факторам генетически детерминирована. Поэтому в наскальных антарктических экосистемах те микроорганизмы приспосабливаются к изменению условий окружающей среды (из числа как аллохтонных, так и автохтонных микроорганизмов), которые способны реализовать определённую стратегию выживания, например, имеют механизмы резистентности к высокому уровню солнечной радиации и/или пигментированы.

Работа выполнялась согласно гранту НАНЦ (проект № 1162) «Структурно-функциональна характеристика мікробних ценозів в Антарктиді», а также согласно Международному проекту 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».

Литература

1. **Методы общей бактериологии:** Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхард и др. – Москва: Мир, 1983. – Т.3. – 263 с.
2. **Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р.** Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Микробиол. журнал. – 1996. – 58, № 3. – С. 3–11.
3. **Романовская В.А., Рокитко П.В., Малашенко Ю.Р., Черная Н.А.** Чувствительность к стрессовым факторам почвенных бактерий, изолированных из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Микробиология. – 1999. – 68, № 4. – С. 534–539.
4. **Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Малашенко Ю.Р.** Идентификация штаммов *Methylobacterium* с использованием сиквенс-анализа генов 16S рРНК // Микробиология. – 2004. – 73, № 6. – С. 846–848.
5. **Рубан Е.Л., Лях С.П., Хрулева И.М., Титова И.А.** Меланиновые пигменты *Nadsoniella nigra* // Известия АН СССР. Сер. Биол. – 1969. – № 1-3. – С. 134–148.