

ВОЗДЕЙСТВИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ, НИЗКОГО ДАВЛЕНИЯ И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА СЕРОЗЕМА КАК АНАЛИТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МАРСИАНСКОГО РЕГОЛИТА

Чепцов В.С.¹, Воробьева Е.А.^{1,2}, Горленко М.В.¹, Манучарова Н.А.¹, Павлов А.К.³, Вдовина М.А.³, Ломасов В.Н.⁴, Звягинцев Д. Г.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия (119991, Москва, Ленинские горы, 1), e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com

²ФГБУН «Институт космических исследований Российской академии наук», Москва, Россия (117997, Москва, ул. Профсоюзная, 84/32)

³ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия (194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26)

⁴ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет», Санкт-Петербург, Россия (195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29)

Астробиология поставила перед исследователями вопросы о пределах устойчивости биологической жизни и возможности ее существования вне Земли. Изучается жизнеспособность земных организмов на околоземной орбите, проводятся лабораторные модельные эксперименты по исследованию влияния множественного воздействия физико-химических факторов на живые организмы. Особое внимание уделяется одному из важнейших внеземных факторов – ионизирующей радиации. Инопланетная среда или открытый космос характеризуются сочетанием наиболее экстремальных для биологической жизни воздействий. Реакция организмов на подобные условия изучена слабо. Исследования, начатые в космосе, и данные лабораторного моделирования дают основания полагать, что устойчивость земной формы жизни превосходит имеющиеся представления. При этом взаимодействие микроорганизмов с минеральным матриксом в составе инопланетного грунта или метеорита и присущая им способность длительно переживать неблагоприятные воздействия могут оказаться необходимыми и достаточными свойствами биологической формы жизни для ее распространения в Солнечной системе и за ее пределами. Целью настоящей работы явилось изучение совместного воздействия высокой дозы гамма-излучения (100 кГр), низкой температуры (–50°C) и низкого давления (1 торр) как ключевых параметров марсианского грунта и открытого космоса на микробное сообщество серозема из пустыни Негев (Израиль). Показано, что экстремальное воздействие не приводит к гибели бактериального комплекса *in situ*, а вызывает изменения в физиологическом состоянии клеток при сохранении их численности. При изменении условий возможен возврат микробного сообщества к исходному состоянию.

Ключевые слова: астробиология, Марс, гамма-излучение, микробные сообщества, почва

INFLUENCE OF GAMMA RADIATION, LOW PRESSURE AND LOW TEMPERATURE ON VIABILITY OF MICROBIAL COMMUNITY OF THE GRAY SOIL AS ANALYTICAL MODEL OF MARTIAN REGOLITH

Cheptsov V.S.¹, Vorobyova E.A.^{1,2}, Gorlenko M.V.¹, Manucharova N.A.¹, Pavlov A.K.³, Vdovina M.A.³, Lomasov V.N.⁴, Zvyagintsev D.G.

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1), e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com

²Space Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia (117997, Moscow, Profsoyuznaya street, 84/32)

³Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia (194021, Saint-Petersburg, Polytechnicheskaya street, 26)

⁴Saint-Petersburg State Polytechnical University, Saint-Peterburg, Russia (195251, Russia, Saint-Petersburg, Polytechnicheskaya street, 29)

Astrobiology has set to researchers the questions about the limits of biological life and the its existence beyond the Earth. The viability of terrestrial organisms is studied in the low Earth orbit, and model experiments are conducted studying the influence of different physical and chemical factors on living organisms. Particular attention is paid to ionizing radiation as one of the most important space factors. Extraterrestrial environment and open space are characterized by the most extreme impacts on life. Life response in such conditions is poorly studied. Space research and laboratory modeling data give evidences that the stability of the Earth's life forms surpasses existing ideas. The interaction of microorganisms with the mineral matrix in soil or meteorites, and

their inherent ability to survive long-term stress may be estimated as necessary and sufficient properties of biological life for its distribution in the Solar System and beyond. The aim of this work was to study the combined effects of high doses of gamma radiation (100 kGy), low temperature (-50°C) and low pressure (1 torr) as the key parameters of the Martian soil and open space on the microbial community of the desert gray soil. It is shown that the extreme impact does not result in the death of the bacteria *in situ*, and causes changes in the physiological state of the cells while maintaining their abundance. Microbial community can be returned to its original state after changing the environmental conditions.

Keywords: astrobiology, Mars, gamma radiation, microbial communities, soil

На сегодняшний день перед астробиологией стоит ряд вопросов, наиболее важными из которых являются проблемы происхождения жизни, пределы ее существования, возможность жизни на других планетах. В связи с этим проводятся модельные эксперименты, позволяющие выявлять разнообразные адаптационные возможности микроорганизмов за пределами планетного варьирования воздействующих физико-химических факторов в условиях, приближенных к конкретным целевым объектам астробиологии. Прогноз эволюции, потенциально возникшей на раннем этапе марсианской биосферы, необходимо подразумевает анализ воздействия в числе важнейших факторов ионизирующей космической радиации. В подповерхностных слоях грунта, недоступных ультрафиолету, этот фактор приобретает лимитирующий статус. Длительное его воздействия имеет следствием гибель клеток вследствие накопления смертельной дозы или, напротив, адаптивную эволюцию при наличии репаративных возможностей в клетках. Таким образом, для астробиологического прогноза возможности обнаружения биологической жизни в грунте Марса одним из ключевых является вопрос о предельных дозах ионизирующей радиации для микробных сообществ *in situ*.

Целью настоящей работы явилось изучение совместного воздействия гамма-излучения в дозе 100 кГр, низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) как ключевых параметров марсианского грунта и открытого космоса на естественное бактериальное сообщество серозема из пустыни Негев (Израиль).

Материалы и методы

В работе использован образец серозема, отобранный в пустыне Негев вблизи г. Авдат (30°47'N/34°46'E) с глубины 5–10 см (горизонт А) [3]. Выбор объекта исследования обусловлен тем, что природные экстремальные местообитания Земли, в том числе почвы и породы пустынь, рассматриваются как земные аналоги марсианского реголита ввиду сходства ряда воздействующих факторов среды, таких как сильное высушивание, высокая инсоляция и др. [7].

Перед облучением навеску образца увлажняли стерильной водой и инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 10 суток с целью активации микробного сообщества, затем высушивали до воздушно-сухого состояния в течение суток при той же

температуре. Для облучения образец помещали в ранее описанную климатическую камеру [8], позволяющую поддерживать давление 1 торр и температуру -50°C в течение всего времени облучения. Облучение проводили на гамма-установке К-120000 с источниками ^{60}Co при интенсивности излучения 1 кГр/ч. Контролем служил активированный необлученный образец. После облучения до проведения анализов образцы хранили при -18°C .

Определение численности культивируемых бактерий проводили методом посева на твердые питательные среды: глюкозо-пептоно-дрожжевую (ГПД) и $\frac{1}{2}$ R2A («Difco», США). Перед посевом проводили десорбцию микроорганизмов на вортексе Heidolph Multi Reax в течение 30 мин при 2000 об./мин. Суспензии образцов в различных разведениях рассеивали в трехкратной повторности с одновременным контролем стерильности среды и контролем присутствия воздушной микрофлоры. Культивирование проводили при температуре $+28^{\circ}\text{C}$.

Общую численность прокариот в образцах определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии (ЭФМ) с акридином оранжевым. Десорбцию клеток проводили с помощью ультразвука (22 кГц, 0.4 А, 2 мин). Препараты готовили в шестикратной повторности и фиксировали нагреванием, затем окрашивали и просматривали на микроскопе Биомед-6 ПР ЛЮМ при увеличении $\times 700$ по 20 полей зрения для каждой повторности. Учитывали клетки с зеленым свечением. Численность прокариот рассчитывали по формуле $N=(S_1 \times a \times n)/(V \times S_2 \times c)$, где N – число клеток в 1 г почвы; S_1 – площадь препарата (мкм^2); a – количество клеток в поле зрения; n – показатель разведения; V – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм^2); c – навеска почвы (г).

Оценку численности отдельных групп микроорганизмов в исследуемых образцах проводили с помощью метода флуоресценции *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH-fluorescent *in situ* hybridization). В настоящей работе были применены зонды ARCH915 и EUB338 («Синтол», Россия), специфичные для представителей доменов *Archaea* и *Bacteria* соответственно. Анализ проводили по методике, описанной ранее [2]. Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе ZEISS Mikroskop Axioskop 2 plus со светофильтрами Filter set15 по 64 поля зрения. Учитывали бактерии с красным свечением. Численность клеток рассчитывали по формуле $N=(S_1 \times a \times n)/(V \times S_2 \times c)$, где N – число клеток в 1 г почвы; S_1 – площадь препарата (мкм^2); a – количество клеток в поле зрения; n – показатель разведения; V – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм^2); c – навеска почвы (г).

Оценку функционального состояния микробных сообществ в исследуемых образцах почвы проводили на основе спектров потребления органических субстратов методом мультисубстратного тестирования (МСТ) [1]. Навески почвы массой 0,3 г помещали в

центрифужный стаканчик, заливали дистиллированной водой (1:100), десорбировали клетки с помощью ультразвука (22 кГц, 0,4 А, 2 мин), затем осаждали минеральные частицы центрифугированием (2000g, 2 мин). К выделенной фракции микробного сообщества добавляли индикатор потребления субстратов (соль тетразолия), перемешивали и вносили по 200 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета «Эко-Лог[®]», содержащего набор из 47 тест-субстратов в двух повторностях [1]. Планшеты инкубировали в термостате при 28°C в течение 72 ч. После окончания инкубации фотометрически считывали оптическую плотность ячеек в диапазоне 510 нм и на основании полученных данных с помощью программного обеспечения «Эко-Лог[®]» вычисляли массив коэффициентов функционального биоразнообразия исследуемого микробного сообщества, являющихся характеристическими признаками его состояния [1].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ STATISTICA 8.0 и Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

После облучения численность аэробных гетеротрофных бактерий, способных к росту и размножению на питательных средах (КОЕ/г), снизилась с $9,5 \times 10^7$ до $6,4 \times 10^6$ кл/г и с 1×10^8 до $3,8 \times 10^7$ кл/г на средах ГПД и $\frac{1}{2}$ R2A соответственно, однако сохранилась на высоком уровне. Важно отметить высокое биоразнообразие бактериальных сообществ в облученных образцах. Общая численность прокариот, учитываемая методом эпифлуоресцентной микроскопии (ЭФМ), практически не изменилась ($8,3 \times 10^8$ и $6,7 \times 10^8$ кл/г) (рис. 1). Проведенный FISH-анализ показал присутствие в составе микробных сообществ контрольного и облученного образцов архей и бактерий. Применение FISH-анализа подтвердило данные ЭФМ об отсутствии ингибирующего эффекта с точки зрения общего обилия прокариот в образце при воздействии ионизирующего излучения в высокой дозе. Кроме того, выявлено, что бактериальные и архейные сообщества *in situ* находятся преимущественно в метаболически активном состоянии. После воздействия на образец гамма-излучения отмечено увеличение численности метаболически активных клеток обеих рассматриваемых групп микроорганизмов в 2–2,5 раза (рис. 2), при этом несколько возросла доля архей в прокариотном комплексе (с 11% до 14%). Такой результат указывает на то, что до облучения часть клеток находилась в покоящемся состоянии и данным методом не обнаруживалась. Активизация клеток вызвана стрессовым воздействием и, по-видимому, связана с активной репарацией полученных повреждений. При этом, несмотря на увеличение содержания активных клеток, количество КОЕ снижалось, т.е. часть фиксируемых прямым методом метаболически активных клеток бактерий перестала культивироваться на используемых питательных средах, что может быть связано как с нарушением генеративных

механизмов, так и с изменением функциональных физиологических свойств отдельных популяций. На основании полученных данных можно заключить, что совокупное воздействие гамма-излучения в высокой дозе 100 кГр, низкой температуры и низкого давления не приводит к гибели прокариотных комплексов почв и осадочных пород, но вызывает изменение их репродуктивной и метаболической активности. При воздействии совокупности стрессовых факторов отдельные популяции переходят в некультивируемое, но метаболически активное состояние, что является защитной реакцией на стрессовое воздействие.

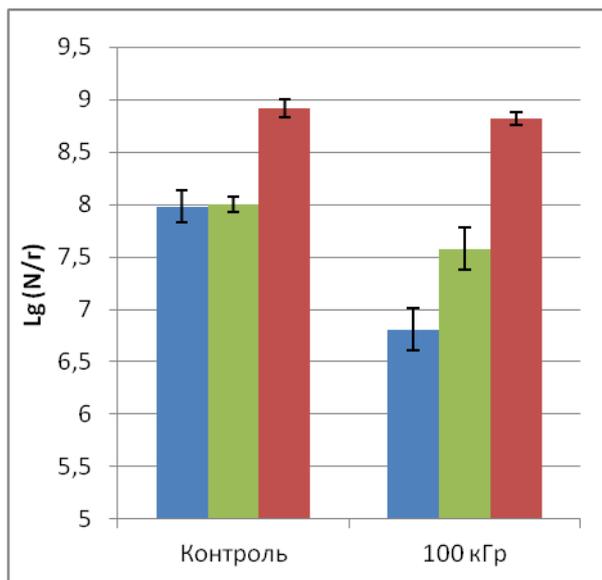


Рис. 1. Влияние гамма-излучения (100 кГр), низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность прокариот в образце серозема. КОЕ/г, ГПД – синий; КОЕ/г, $\frac{1}{2}$ R2A – зеленый; общая численность прокариот (кл/г), ЭФМ – красный. Значение погрешности соответствует стандартному отклонению

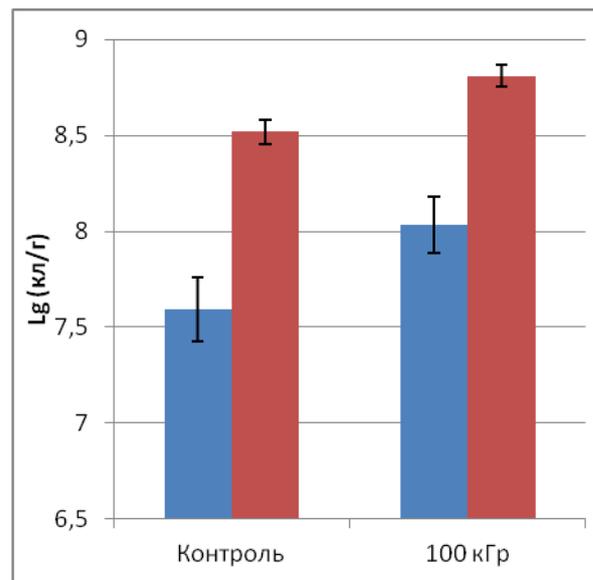


Рис. 2. Влияние гамма-излучения (100 кГр), низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность метаболически активных клеток бактерий и архей в образце серозема (FISH). Археи, кл/г – синий; бактерии, кл/г – красный. Значение погрешности соответствует стандартному отклонению

Примененное воздействие способствовало изменению функционального состояния микробного сообщества *in situ*. После облучения снизились удельная метаболическая работа, интегральный показатель общего благополучия системы и индекс Шеннона, произошло значительное сужение спектра потребляемых субстратов (табл. 1). Сократилась ассимиляция всех номинальных групп субстратов, при этом наиболее заметно снижение потребления гексоз (на 84%) и спиртов (на 71%) (рис. 3). Однако коэффициент рангового распределения спектров потребления субстратов, отражающий степень нагрузки на сообщество и возможность его восстановления, практически не изменился и был равен 0,485, что характерно для систем с истощенными ресурсами или находящихся под обратимым воздействием какого-либо нарушающего фактора [1].

Таким образом, при воздействии на микробное сообщество серозема гамма-излучения в дозе 100 кГр в сочетании с давлением 1 торр и температурой -50°C функциональное состояние его несколько ухудшилось, произошла перестройка его метаболизма, однако сохранились высокий потенциал бактериальной биомассы, ее разнообразия и возможность восстановления и нормального функционирования сообщества.

Таблица 1

Параметры функционального состояния микробного сообщества серозема до и после воздействия модельных условий.

Параметр функционального состояния микробного сообщества	Образец	
	Контрольный	Облученный
Коэффициент рангового распределения спектров потребления субстратов, d	0,449	0,485
Количество потребляемых субстратов, N	24	14
Удельная метаболическая работа, W	1754,4	1203,9
Выравненность, E	0.99	0,98
Индекс Шеннона, H	4.52	3.73
Интегральный показатель общего благополучия системы, G	113,7	61,4

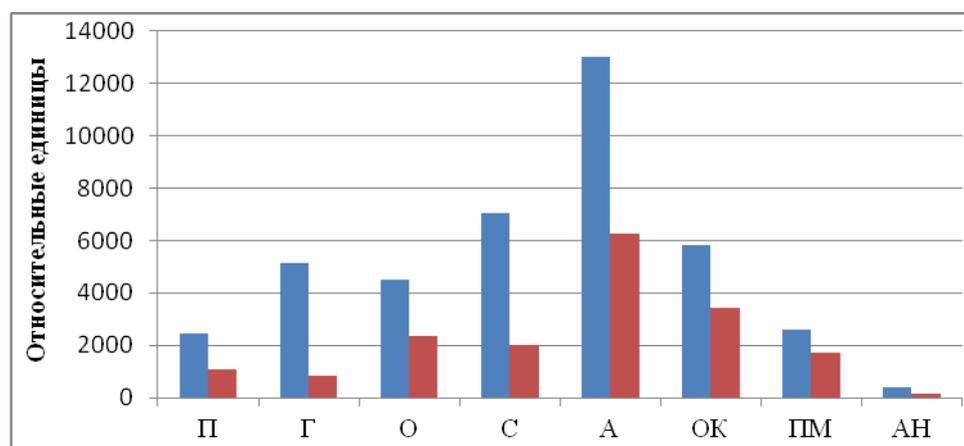


Рис. 3. Потребление номинальных групп субстратов сообществом образца SN до и после воздействия гамма-излучения (100 кГр), низкого давления (1 торр) и низкой температуры (-50°C). Контрольный образец – синий; облученный образец – красный. П — пентозы; Г — гексозы; О — олигосахара; С — спирты; А — аминокислоты; ОК — соли органических кислот; ПМ — полимеры; АН — амиды, нуклеозиды

Заключение

Природный грунт представляет собой сложную гетерогенную и гетерофазную среду обитания микроорганизмов. Распределение микробной биомассы и воздействие физико-химических факторов в такой среде имеют дискретный неравномерный характер. Микроорганизмы обладают различной генетически обусловленной радиорезистентностью, но также механизмами переживания стресса и адаптации. Вступая во взаимодействие с

гетерогенной средой, микробные популяции и сообщества приобретают дополнительные шансы стабилизации, способность не ограниченного временем существования и функционирования в наиболее экстремальных условиях Земли (Vorobyova et al., 1997).

Моделирование множественного экстремального воздействия позволяет рассмотреть потенциальные возможности биологической активности природного грунта (почвы, породы) с превышением земных условий и приближением к условиям инопланетным (Марс) или космической среды. Проведенное исследование показало, что воздействие гамма-излучения в дозе 100 кГр в условиях низкого давления и низкой температуры не только не приводит к гибели микробного сообщества, но фактически не влияет на общую численность прокариот и содержание способных к росту и размножению аэробных гетеротрофных бактерий. Ранее сообщалось о культивировании бактерий из почв, облученных гамма-излучением в дозах вплоть до 65 кГр [6]. Наиболее радиорезистентные виды бактерий, такие как *Deinococcus radiodurans* и *Rubrobacter radiotolerans*, в чистой культуре устойчивы к воздействию гамма-излучения в дозах до 25 кГр [4, 5], а при понижении температуры во время облучения до –79°C *Deinococcus radiodurans* сохраняет жизнеспособность при воздействии доз до 80 кГр [4]. Сведения о сохранении бактериями жизнеспособности после облучения гамма-излучением в дозах более 80 кГр на данный момент отсутствуют. Исследование свидетельствует лишь о некоторых изменениях в метаболической активности клеток и функциональном состоянии сообщества при сохранении возможности его восстановления. Такой результат может быть объяснен как протекторной ролью природной гетерофазной среды по отношению к иммобилизованным в органоминеральной матрице клеткам, так и условиями облучения, в первую очередь низкотемпературным режимом [4].

Полученные данные подтверждают возможность длительного выживания микроорганизмов в приповерхностном слое марсианского реголита в случае формирования на раннем Марсе биосферы земного типа. Исследование дает основания и для подтверждения вероятности сохранения и переноса жизнеспособных микроорганизмов в космическом пространстве.

Результаты исследования могут быть учтены при планировании миссий к Марсу с астробиологическими задачами. Авторы благодарят Р. Энджела и О.Р. Коцюрбенко за предоставленные образцы аридных почв.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01982) и Программы РАН «Эволюция органического мира и планетарных процессов» (подпрограмма 2).

Список литературы

1. Горленко М. В., Кожевин П. А. Мультисубстратное тестирование природных микробных сообществ. — М.: МАКС Пресс, 2005. — 88 с.
2. Манучарова Н. А. Идентификация метаболически активных клеток прокариот в почвах с применением молекулярно биологического флюоресцентно-микроскопического метода анализа fluorescence in situ hybridization (FISH). М.: Университет и школа. — 2008. — 23 с.
3. Angel R. et al. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient //The ISME journal. — 2010. — Т. 4. — № 4. — С. 553–563.
4. Dartnell L. R. et al. Low-temperature ionizing radiation resistance of *Deinococcus radiodurans* and Antarctic Dry Valley bacteria //Astrobiology. — 2010. — Т. 10. — № 7. — С. 717–732.
5. Ferreira A. C. et al. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus* //Extremophiles. — 1999. — Т. 3. — № 4. — С. 235–238.
6. McNamara N. P. et al. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils //Applied Soil Ecology. — 2003. — Т. 24. — № 2. — С. 117–132.
7. Parro V. et al. A microbial oasis in the hypersaline Atacama subsurface discovered by a life detector chip: implications for the search for life on Mars //Astrobiology. — 2011. — Т. 11. — № 10. — С. 969–996.
8. Pavlov A. K. et al. Growth of microorganisms in martian-like shallow subsurface conditions: laboratory modelling //International Journal of Astrobiology. — 2010. — Т. 9. — № 01. — С. 51–58.
9. Vorobyova E. et al. The deep cold biosphere: facts and hypothesis //FEMS Microbiology Reviews. — 1997. — Т. 20. — № 3–4. — С. 277–290.

Рецензенты:

Степанов А.Л., д.б.н., профессор кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва;

Чернов И.Ю., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва.