

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ, НИЗКОГО ДАВЛЕНИЯ И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ И РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *KOCURIA ROSEA* И *ARTHROBACTER POLYCHROMOGENES*

Чепцов В.С.¹, Воробьева Е.А.^{1,2}, Тамбиев А.Х.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, e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com;

²ФГБУН «Институт космических исследований Российской академии наук», Москва;

³ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук», Санкт-Петербург;

⁴ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет», Санкт-Петербург

В исследовании была поставлена задача оценить реакцию ферментных антиоксидантных систем бактерий, иммобилизованных в глинистый минерал монтмориллонит на воздействие ионизирующей радиации в больших дозах в сочетании с другими космическими факторами. Проведено облучение гамма-излучением двух штаммов бактерий *Kocuria rosea* SN_T60 и *Arthrobacter polychromogenes* SN_T61 в условиях, моделирующих основные физические параметры поверхностного слоя реголита Марса (температура -50 °С, давление 1 торр), как одного из наиболее перспективных астробиологических объектов Солнечной системы. Окислительная способность экзометаболитов и активность ферментов окислительного стресса на примере каталазы изучены в динамике при выращивании бактериальных культур после облучения. Экспонирование в модельных условиях не только не привело к гибели микроорганизмов, но, напротив, вызвало активную репродукцию клеток. Совокупное воздействие экстремальных факторов вызывало повышение антиокислительной активности экзометаболитов и возрастание каталазной активности исследованных бактерий, что свидетельствует о комплексном ответе антиоксидантной системы бактерий на стрессовое воздействие.

Ключевые слова: гамма-излучение, Марс, астробиология, *Kocuria rosea*, *Arthrobacter polychromogenes*, активность.

INFLUENCE OF GAMMA RADIATION, LOW PRESSURE AND LOW TEMPERATURE ON CATALASE ACTIVITY AND REACTIVITY OF EXOMETABOLITES OF *KOCURIA ROSEA* AND *ARTHROBACTER POLYCHROMOGENES*

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

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: cheptcov.vladimir@gmail.com;

²Space Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow;

³Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg;

⁴Saint-Petersburg State Polytechnical University, Saint-Peterburg

The study was tasked to evaluate the response of antioxidant enzyme systems of bacterial cells immobilized into the clay mineral montmorillonite to ionizing radiation in large doses in combination with other space factors. Two bacterial strains: *Kocuria rosea* SN T60 and *Arthrobacter polychromogenes* SN T61, were irradiated by gamma rays in conditions simulated main physical characteristics of the surface layer of martian regolith (-50°C, 1 Torr), because Mars is one of the most promising astrobiological targets in the Solar system. The oxidative activity of bacterial exometabolites and activity of one of enzymes of oxidative stress catalase were investigated in dynamics in growing bacterial cultures after irradiation. Exposure to model conditions did not led to the death of microorganisms, but, on the contrary, caused active cell reproduction. The cumulative impact of extreme factors caused increasing antioxidant activity of exometabolites, and catalase activity of liquid bacterial cultures also has enhanced. These data indicates the complex response of microbial antioxidant systems on multifactorial stress.

Keywords: gamma radiation, Mars, astrobiology, *Kocuria rosea*, *Arthrobacter polychromogenes*, activity.

Известное допущение о возможности существования в прошлом или настоящем жизни за пределами нашей планеты основано на новых представлениях об устойчивости

микроорганизмов к воздействию экстремальных физико-химических факторов, в том числе космических факторов. Планетные исследования, изучение природных экстремальных биотопов Земли, моделирование потенциальных внеземных условий обитания позволяют оценивать возможность существования форм жизни земного типа на различных объектах Солнечной системы, выбирать перспективные регионы для астробиологического поиска, разрабатывать и совершенствовать методы обнаружения жизни. Устойчивость микроорганизмов *in situ* в природных местообитаниях, в основе которой лежат адаптационные механизмы клетки, популяций и целых микробных сообществ, запускаемые первичными реакциями на стресс, имеет эволюционный характер развития. Эти процессы должны быть исследованы применительно к различным сочетаниям воздействия факторов, формирующих ту или иную среду. Опираясь на данные по высокой жизнеспособности микроорганизмов в природной среде, и особенно в экстремальных местообитаниях, астробиология ставит задачу расширенного переосмысливания механизмов реакции на стресс и последующей адаптации клеток с экстраполяцией знаний на космическую и инопланетную среду и учетом эволюционных планетарных процессов.

При анализе космической или инопланетной среды как потенциальной среды обитания одним из ключевых факторов воздействия является ионизирующая радиация. Специфика воздействия этого фактора, с точки зрения астробиологии, заключается не только в широком диапазоне варьирования показателей применительно к различным объектам Солнечной системы, но и в аккумуляции дозы для биообъектов. Пределы устойчивости земной формы жизни к воздействию ионизирующих излучений достоверно не определены, а многие эксперименты по исследованию влияния радиации на биообъекты не учитывают совокупного эффекта факторов среды, модифицирующих воздействие ионизирующих излучений [4, 9]. Это требует дальнейших исследований и моделирования в условиях, наиболее близких к параметрам целевых астробиологических объектов.

В настоящей работе изучена реакционная способность экзометаболитов и активность ферментов окислительного стресса на примере каталазы после облучения гамма-излучением бактерий *Kocuria rosea* SN_T60 и *Arthrobacter polychromogenes* SN_T61 в условиях, моделирующих основные физические параметры поверхностного слоя реголита Марса (температура -50 °С, давление 1 торр).

Материалы и методы

Объектом исследования являлись штаммы *Kocuria rosea* SN_T60 и *Arthrobacter polychromogenes* SN_T61, выделенные из описанного нами ранее образца серозема из пустыни Неgev (Израиль) [3] при посеве на разбавленную среду TSA (1:2) (Difco, США). Идентификация штаммов была проведена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на

MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Анализ полученных спектров проводили с помощью программы MALDI Biotyper 3.0.

Для проведения облучения отбирали биомассу в стационарной фазе роста, суспендировали в стерильной воде, вносили в стерильный (трижды автоклавированный в течение 20 минут при 121°C) монтмориллонит и тщательно перемешивали, затем просушивали в термостате в течение 3 суток при 28°C.

Навески монтмориллонита с внесенными в него клетками помещали в описанную нами 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 ⁶⁰Со при интенсивности излучения 0.5 кГр/ч и 3 кГр/ч. Помимо исходной культуры исследовали контрольный вариант при воздействии низкого давления и температуры без проведения облучения.

Определение численности культивируемых бактерий проводили методом посева на плотную глюкозо-пептоно-дрожжевую питательную среду (ГПД): пептон – 2 г/л; глюкоза – 1 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; гидролизат казеина – 1 г/л; СаСО₃ – 1 г/л, агар-агар - 20 г/л. Перед посевом проводили десорбцию микроорганизмов на вортексе Heidolph Multi Reax в течение 30 минут 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 комнатной температуре.

Реакционную способность экзометаболитов (РС, окислительную – ОА и антиокислительную – АОА активность) определяли методом химических моделей [2]. В качестве модели использовали 0,04%-ный раствор 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) в дистиллированной воде. ОА и АОА определяли соответственно по повышению или понижению скорости реакции окисления ДОФА в контроле (чистая жидкая среда ГПД) и при добавлении культуральной жидкости бактерий, содержащей нативные экзометаболиты. Ускорение или торможение реакции окисления ДОФА культуральной жидкостью по сравнению с чистой средой определялось тангенсом угла наклона кривой нарастания оптической плотности во времени при постоянной температуре 45 °C на приборе «Аквакон-4» [2]. Культуральную жидкость отделяли от клеток с помощью фильтрования через шприцевые мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). Измерения проводили в трехкратной повторности.

Активность каталазы в культуральной жидкости определяли газометрически, согласно методике, описанной ранее [1]. Измерения проводили в трехкратной повторности.

Результаты и обсуждение

Оба штамма проявили высокую устойчивость к совокупному воздействию экстремальных факторов. После облучения в модельных условиях Марса число колониобразующих единиц (КОЕ) *K. rosea* и *A. polychromogenes* возросло в 1.7–2.6 раз. В контрольном эксперименте после воздействия низкой температуры и давления (без облучения) число КОЕ *K. rosea* увеличилось в 6.5 раз (рис. 1, 2). Таким образом, увеличение численности культивируемых клеток явилось ответом на воздействие низкой температуры, и, возможно, низкого давления, но не гамма-излучения. Высушивание иммобилизованной в минерале культуры в вакууме способствовало дополнительной иммобилизации клеток, что могло привести к изменению их физиологического состояния и метаболизма. Известно, что замораживание-оттаивание может способствовать активизации пролиферации клеток [10]. Согласно литературным данным, доза гамма-излучения 2 кГр приводила к гибели 90 % клеток популяции *K. rosea* [6]. Однако в нашем эксперименте доза 1 кГр в вакууме при низкой температуре не подавляла численность репродуцирующих клеток. Это может быть объяснено различно: а) снижением радиационных повреждений клеток вследствие проведения облучения при отрицательной температуре [4]; б) гетерогенностью бактериальных популяций [6] и компенсацией ингибирующего воздействия на компоненты популяции ионизирующего излучения за счет активизации других компонентов вследствие воздействия температурных флуктуаций и вакуума, проявившегося в необлученном контроле; в) высокой устойчивостью к множественному стрессу штаммов, адаптированных к экстремально ксерофитным местообитаниям [7]. Воздействие целого ряда экстремальных физических факторов проявляется через окислительный стресс, что позволяет микроорганизмам активизировать вполне универсальные механизмы отклика с последующей адаптацией в стабильно неблагоприятных условиях [5].

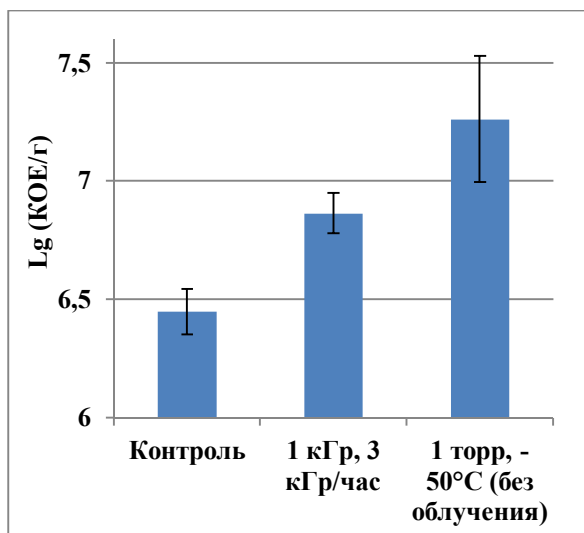


Рис. 1. Влияние гамма-излучения (1 кГр), низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность культивируемых клеток *K. rosea* SN_T60. Значение погрешности соответствует стандартному отклонению

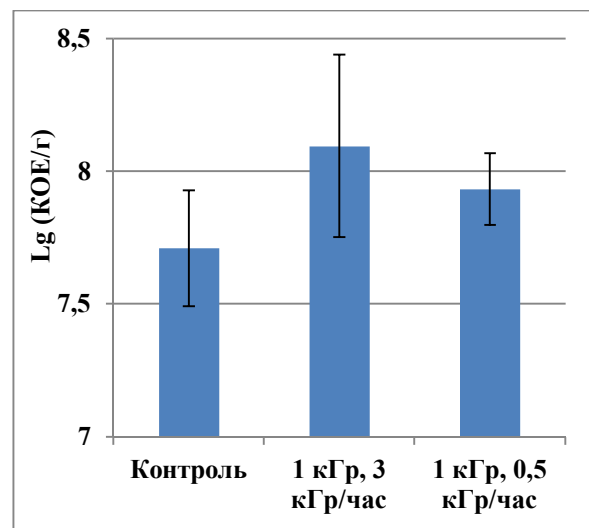


Рис. 2. Влияние гамма-излучения (1 кГр), низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность культивируемых клеток *A. polychromogenes* SN_T61. Значение погрешности соответствует стандартному отклонению

Экстремальное воздействие исследованной совокупности физических факторов значительно повлияло на реакционную способность экзометаболических бактериальных штаммов. У контрольного штамма *K. rosea* в первые 6 суток культивирования РС лежит в области антиокислительной активности, достигая наибольших значений АОА к 6 ч и 72 ч роста, затем переходит в область окислительной активности с максимумом ОА на 10 сутки. После этого происходит плавное снижение ОА (рис. 3). У штамма *K. rosea* SN_T60 после экспонирования в режиме условий Марса РС резко изменяется в тех же точках (6 ч, 30 ч, 72 ч, 10 суток), что и у контрольного варианта. Однако в период 6–48 ч роста экзометаболические вещества обладают до 27 % более высокой окислительной активностью. В дальнейшем оба экспонированных варианта (облученный и необлученный) проявляют значительно более высокую АОА, чем контроль: в период с 3 по 25 сутки АОА превышает уровень контроля на 40–90 %. При этом активность антиоксидантов выше при вакуумировании при отрицательной температуре.

Еще более значительно проявилось повышение АОА после облучения у штамма *A. polychromogenes* SN_T61. За весь период измерений РС экзометаболических веществ контрольного штамма находилась в окислительной области, РС экспонированных вариантов штамма – в антиокислительной (рис. 4). С 10 ч. до 25 суток роста АОА в облученном варианте на 75–150 % превышала уровень контроля. Принципиальных расхождений между вариантами, получившими равные дозы в режимах различной интенсивности облучения, не отмечено.

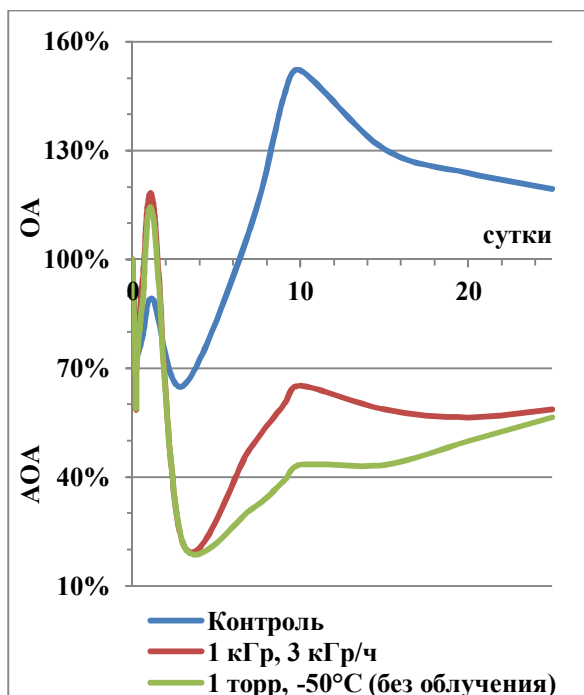


Рис. 3. Изменение РС экзометаболитов *K. rosea* SN_T60 после воздействия гамма-излучения, низкого давления и низкой температуры. ОА – область окислительной активности; АОА – область антиокислительной активности

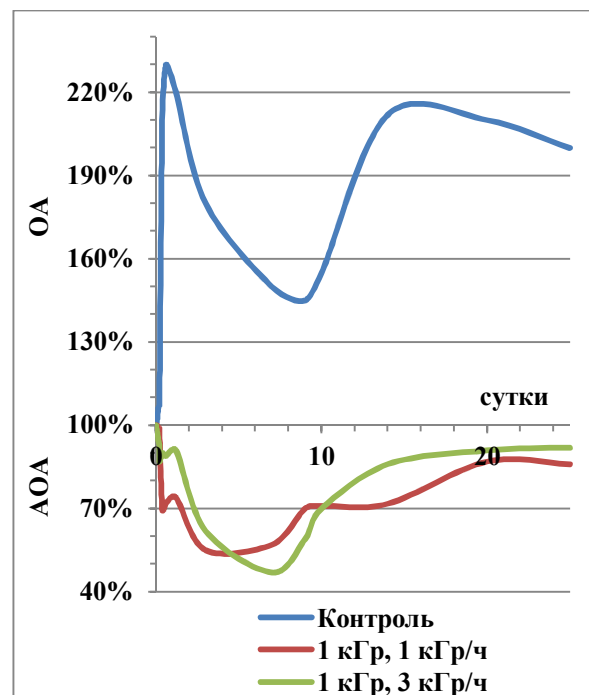


Рис. 4. Изменение РС экзометаболитов *A. polychromogenes* SN_T61 после воздействия гамма-излучения, низкого давления и низкой температуры. ОА – область окислительной активности; АОА – область антиокислительной активности

Увеличение АОА экзометаболитов согласуется с повышением каталазной активности культуральной жидкости *K. rosea* после облучения (таблица). В период до 3 суток роста каталазная активность исходного штамма и в облученном варианте была одинакова. Однако в дальнейшем активность культуры после облучения возрасла в 2 раза относительно контроля. Повышение АОА экзометаболитов и увеличение каталазной активности свидетельствует о комплексном ответе антиоксидантной системы исследованных штаммов бактерий на воздействие стрессовых условий.

Влияние гамма-излучения, низкого давления и низкой температуры на каталазную активность культуральной жидкости *K. rosea* SN_T60. Значение погрешности соответствует стандартному отклонению

Время роста, сутки	Каталазная активность, мл O ₂ /мл культуральной жидкости за минуту	
	Контроль	Облученный штамм
0.5	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
1	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01
3	0.1 ± 0.02	0.15 ± 0.02
7	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03
10	0.2 ± 0.02	0.4 ± 0.03
14	0.45 ± 0.04	0.9 ± 0.02

Заключение

Исследованные штаммы бактерий продемонстрировали высокую устойчивость к воздействию гамма-излучения, низкого давления и низкой температуры. Экспонирование в модельных условиях поверхностного слоя марсианского реголита не привело к гибели бактерий, напротив, вызвало активную репродукцию клеток и адаптивную реакцию на стрессовое воздействие. Результаты исследования свидетельствуют о возможности выживания и адаптации бактерий в приповерхностном слое марсианского реголита при заносе на Марс микроорганизмов с Земли или в случае формирования на раннем Марсе биосферы земного типа.

Низкое давление и температура значительно снизили степень радиационных повреждений. В связи с этим можно полагать, что устойчивость и длительность потенциального сохранения микроорганизмов в инопланетных и космических условиях (на объектах, где главным лимитирующим фактором является радиация) недооценена.

Результаты исследования представили новые доказательства взаимосвязанных реакций ответа на множественный стресс у бактерий. Практическая перспектива применения этих знаний лежит как в области совершенствования методов астробиологического поиска (выбора ключевых биомаркеров применительно к объекту исследования), так и развитии новых технологий, в частности, во внеземных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01982), а также при частичной (культивирование и идентификация бактерий) поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00029).

Список литературы

1. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д. Г. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
2. Тамбиев А.Х. Реакционная способность экзометаболитов растений. – М.: Изд-во МГУ, 1984. – 72 с.
3. Чепцов В.С. и др. Воздействие гамма-излучения, низкого давления и низкой температуры на жизнеспособность микробного сообщества серозема как аналитическая модель марсианского реголита // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.
4. Baumstark-Khan C., Facius R. Life under conditions of ionizing radiation //Astrobiology. – Springer Berlin Heidelberg, 2002. – С. 261-284.
5. Chattopadhyay M.K. et al. Increase in oxidative stress at low temperature in an Antarctic bacterium // Current microbiology. – 2011. – Т. 62. – №. 2. – С. 544-546.

6. Cox M.M., Battista J.R. *Deinococcus radiodurans* — the consummate survivor //Nature Reviews Microbiology. – 2005. – T. 3. – №. 11. – C. 882-892.
7. Erkus O. et al. Multifactorial diversity sustains microbial community stability //The ISME journal. – 2013. – T. 7. – №. 11. – C. 2126-2136.
8. Pavlov A.K. et al. Growth of microorganisms in martian-like shallow subsurface conditions: laboratory modelling // International Journal of Astrobiology. – 2010. – T. 9. – №. 01. – C. 51-58.
9. Rummel J.D. et al. A new analysis of Mars “special regions”: findings of the second MEPAG Special Regions Science Analysis Group (SR-SAG2) //Astrobiology. – 2014. – T. 14. – №. 11. – C. 887-968.
10. Soina V.S., Vorobyova E.A. Adaptation of Bacteria to the Terrestrial Permafrost Environment // Origins. – Springer Netherlands, 2004. – C. 427-444.