

Выводы

Относительные размеры пухов находятся в обратной зависимости от степени политения хромосом в слюнных железах дрозофилы. В диапазоне температур 17–28 °С размеры поздних экдизоновых пухов у 0-часовых предкуколок дрозофилы возрастают, в среднем, на 6,1–48,3 %.

Полученные данные демонстрируют наличие отрицательной корреляции между степенью умножения генома и пуховой активностью политенных хромосом дрозофилы в связи с варьирующей степенью политения и температурными условиями развития.

Литература

1. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F. et al. Polytene chromosomes: 70 years in genetic research // *Int. Rev. Cytol.* – 2004. – Vol. 241. – P. 203–275.
2. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М. Наука, 1981. – 260 с.
3. Жимулёв И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. – Новосибирск: ВО «Наука». Сибирская издательская фирма, 1994. – 565 с.
4. Pelling G. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium // *Nature.* – 1959. – Vol. 184. – P. 655–656.
5. Страшнюк В. Ю., Непейвода С. Н., Шахбазов В. Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом. // *Генетика.* – 1995. – Т. 31, № 1. – С.24–29.
6. Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. О вариабельности размеров пухов у *Drosophila melanogaster* // *Генетика.* – 1974. – Т.10, №5. С. 74–80.
7. Страшнюк В.Ю., Аль-Хамед С., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитогенетическое и цитобиофизическое исследование механизмов температурных адаптаций и эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig. // *Генетика.* – 1997. – Т. 33, № 6. – С. 793–799.

STRASHNYUK V.Yu., SHALAMOV Yu.A.

V. N. Karazin National University of Kharkiv

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq. 2, e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru

PUFFING ACTIVITY IN POLYTENE CHROMOSOMES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN RELATION TO DIFFERENCES IN POLYTENY LEVEL AND TEMPERATURE CONDITIONS

Aims. The purpose of investigation was to study the puffing activity in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes in relation to variable polyteny level and temperature conditions. **Methods.** The polytene chromosomes were examined on squash aceto-orcein salivary gland preparations. Polyteny level of chromosomes and puff dimensions were defined by cytomorphometric method. **Results.** The relative puff dimensions in polytene chromosomes of 0-hour prepupae were found to correlate negatively with polyteny level of chromosomes. The late ecdysone puffs grew in size in temperature interval 17–28 °С in average by 6,1–48,3 per cent. **Conclusions.** The obtained data demonstrate the negative correlation between the genome amplification and puffing activity in relation to variable polyteny level and temperature conditions.

Key words: *Drosophila melanogaster*, puffing activity, polyteny level, temperature.

ТАШИРЕВ А.Б., ГЛАДКА Г.В., РОМАНОВСКАЯ В.А.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К.Заболотного НАН Украины

Украина, Д 03670, Киев, ул. Заболотного, 154, e-mail: victoriaroman@ukr.net

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ И СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Холод является наиболее распространенным стрессом среди природных экстремальных условий на нашей планете. Так, в 90% массы океанов Земли температура 5°С и ниже. В наземных экосистемах Аляски (85%), России

(55%), Канады (55%) и большей части Антарктиды низкие температуры сохраняются длительный период. Ранее нами из наземных экосистем Западной Антарктики и прилегающих к ней островов Аргентинского архипелага выделены

аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы [2, 4]. Учитывая экстремальные условия Антарктики (низкую температуру, высокий уровень солнечной радиации и повышенную минерализацию в прибрежных экосистемах региона), мы

Материалы и методы

Объектами исследования служили аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы, изолированные ранее при 1–5°C [2] и при 30°C [4] из различных экосистем Антарктики (почва, фитocenозы, биоплёнки обрастания на скалах). Для культивирования бактерий использовали среду Nutrient Agar фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. и глюкозо-картофельную агаризованную среду. Дрожжи выращивали на солодовом агаризованном сусле. Влияние экстремальных факторов на выживаемость микроорганизмов изучали

Результаты и обсуждение

У 55 изолятов, доминирующих в фитocenозах и орнитогенной почве Антарктики, изучены психро- и галотолерантность и определены доминирующие морфовиды на основании морфолого-культуральных признаков. Для изучения резистентности к УФ радиации из них отобрано 16 штаммов бактерий, которые представляли все выявленные морфовиды (роды *Cryobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Halomonas*, *Psychrobacter*), и 9 штаммов дрожжей с характерной пигментацией колоний (угольно-чёрные, красные, молочно-белые).

Влияние УФ радиации. Наличие озоновой «дыры» в Антарктике обуславливает высокий уровень солнечного излучения в регионе. Поэтому мы предположили, что антарктические микроорганизмы должны быть устойчивы к УФ. Действительно, практически все микроорганизмы, изолированные из фитocenозов и почв Антарктики, были резистентны к УФ (рис. 1 и 2). Для большинства бактерий пороговая доза УФ составляла 40–60 Дж/м², для дрожжей – 80–120 Дж/м². Это важный показатель резистентности к УФ, т.к. чем больше пороговая доза облучения (то есть доза, до которой повреждения ДНК могут полностью репарироваться), тем, соответственно, выше способность бактерий к выживанию в экстремальных условиях повышенного УФ излучения.

Летальные дозы УФ для грамотрицательных и грамположительных бактерий различались незначительно (табл.). Наиболее устойчивы к УФ штаммы *Micrococcus* sp. 3194 и 3398, *Methylobacterium* sp. 3294, 3392 и *Cryobacterium* sp. 3179, у которых ЛД_{99,99} составляла 210–360

предположили, что микроорганизмы данного региона должны быть резистентны к этим факторам, что и определило цель наших исследований, а также необходимость рассмотреть стратегию их выживания в экстремальных условиях.

у 55 штаммов, которые доминировали в исследованных природных образцах. Устойчивость к ультрафиолетовому излучению определяли как описано в работе [3]. Для количественной оценки данного показателя вычисляли пороговую дозу УФ радиации, которая является мерой способности клеток к репарации повреждений ДНК, а также летальные дозы УФ (ЛД₉₀ и ЛД_{99,99}). Психро- и галотолерантность микроорганизмов определяли общепринятыми методами в диапазоне 1–40°C и 0.1–200 г NaCl/л, соответственно.

Дж/м² (рис. 1). Пигментированные штаммы дрожжей (чёрные и красные) были высоко резистентны к УФ (ЛД_{99,99} составляла 600–1200 Дж/м²), в то время, как для белых дрожжей ЛД_{99,99} – 250 Дж/м² (рис. 2). Видимо, пигменты минимизировали клеточные повреждения у дрожжей при УФ облучении. 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. Эти признаки изучены у 55 штаммов (40 бактерий и 15 дрожжей). В таблице представлена часть из них (25 штаммов), но они отражают весь спектр морфовидов антарктических изолятов. Показано, что все исследованные антарктические бактерии и дрожжи способны расти при низкой температуре (1°C или 5°C). Среди них выявлены психрофилы, для которых оптимальная температура роста (Т_{opt}) не превышает 15°C, а максимальная – не выше 20°C; а также психротолерантные микроорганизмы, для которых Т_{opt} роста выше 15°C, а максимальная – превышает 20°C. Среди изученных нами антарктических бактерий 70% были психротолерантными, 30% – психрофильными. Все исследованные штаммы антарктических дрожжей были психротолерантными, хотя они способны расти при крайне низких температурах (1–5°C). Чтобы оценить микробную активность в природных условиях Антарктики, мы рассчитали долю (часть) штаммов, которые могут расти при разных температурах в диапазоне 1–40°C. Оказалось, что в диапазоне 1–5°C росло до 80% бак-

терий и 60% дрожжей. Все психротолерантные штаммы росли, как при 1–5°C, так и при 25–30°C. Следовательно, антарктические штаммы способны расти как в температурном диапазоне,

характерном для Антарктики (1–10°C), так и в короткий летний период, когда температура достигает 20°C и выше.

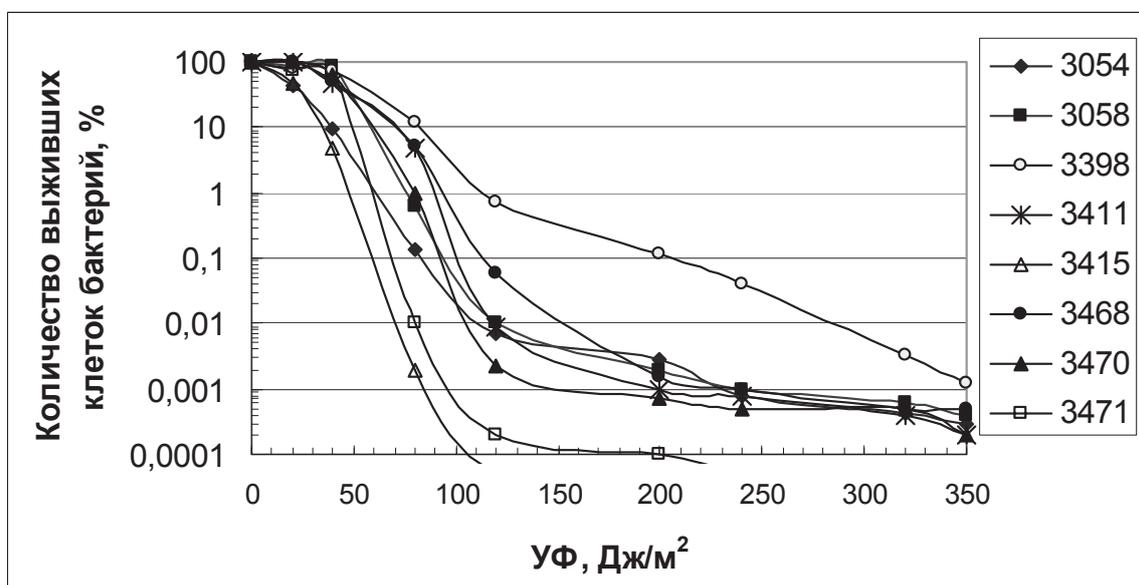


Рис. 1. Дозовые кривые выживаемости антарктических бактерий после УФ облучения. Обозначения на рисунке соответствуют номерам штаммов. 3054, 3058, 3411 – *Corynebacterium* sp.; 3398 – *Micrococcus* sp.; 3415 – *Halomonas* sp.; 3468 – *Psychrobacter* sp.; 3470 и 3471 – *Cryobacterium* sp.

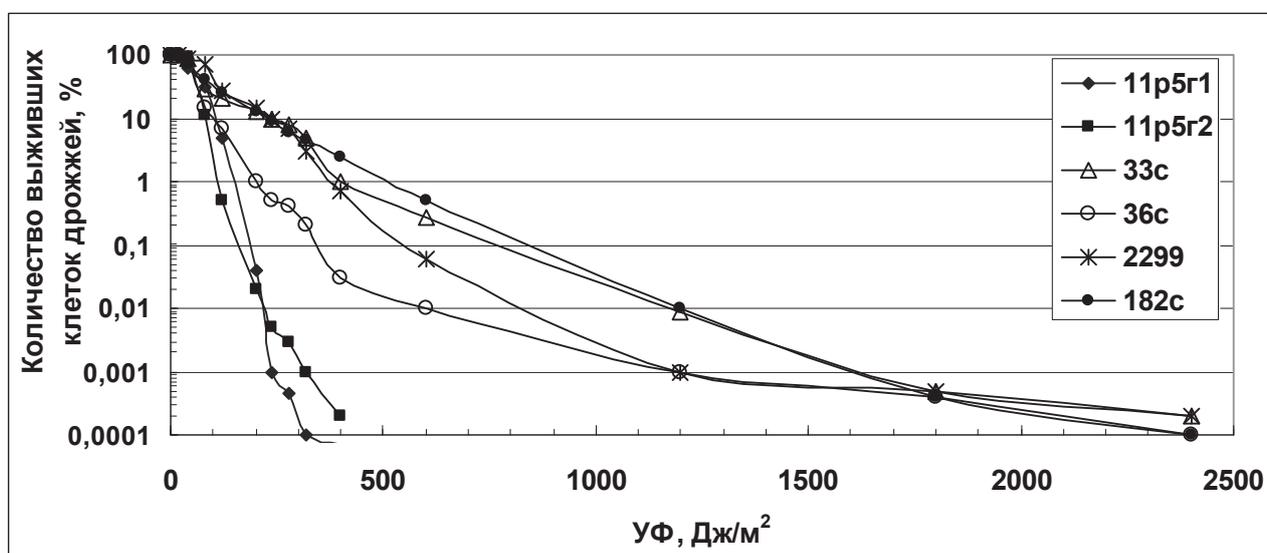


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости антарктических дрожжей после УФ облучения. Обозначения на рисунке соответствуют номерам штаммов: 11p5g1, 11p5g2 (белые); 33c, 182c (красные); 36c, 2299 – *Exophiala nigra* (чёрные)

Проведенные нами эксперименты показали, что более половины антарктических бактерий были умеренно галофильными (растут в среде, содержащей 2.5–15% NaCl). Наиболее устойчивыми к NaCl были отдельные представители *Halomonas* sp. и *Cryobacterium* sp. (рост при 15% и 10% NaCl, соответственно) (табл.). Все исследованные антарктические дрожжи росли в

диапазоне 0–10% NaCl в среде, некоторые – в диапазоне 0–15% NaCl (табл.). Можно предположить, что формирование наземных микроценозов 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.

Таблица. Экофизиологические особенности микроорганизмов, изолированных из наземных экосистем Антарктики

№ штам-мА	Изолирован из экосистемы	Род или морфотип (пигментация)	Летальные дозы УФ, Дж/м ²		Растут в диапазоне	
			ЛД ₉₀	ЛД _{99,99}	NaCl, %	T, °C
Грамотрицательные бактерии						
3088	Почва чёрная	<i>Psychrobacter</i> sp.	50	75	0–0.1	1–30
3468	Почва с мхом	<i>Psychrobacter</i> sp.	60	120	0–0.1	1–30
3469	Зелёный мох	<i>Psychrobacter</i> sp.	80	160	0–0.1	1–30
3294	¹ Чёрный лишайник	<i>Methylobacterium</i> sp.	80	210	0–2.5	1–30
3392	Почва каменистая	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	310	0–2.5	5–30
3189	¹ Чёрный лишайник	<i>Halomonas</i> sp.	50	200	0–15	5–30
3415	Зелёный мох	<i>Halomonas</i> sp.	50	70	0–5	1–30
Грамположительные бактерии						
3179	¹ Чёрный лишайник	<i>Cryobacterium</i> sp.	85	320	0–10	1–30
3275	² Трава	<i>Cryobacterium</i> sp.	50	200	0–5	1–20
3471	Почва со мхом	<i>Cryobacterium</i> sp.	60	80	0–2.5	1–20
3470	Зелёный мох	<i>Cryobacterium</i> sp.	60	110	0–0.1	1–20
3054	Биоплёнка на скале	<i>Corynebacterium</i> sp.	80	170	0–2.5	1–20
3058	Биоплёнка на скале	<i>Corynebacterium</i> sp.	65	110	0–2.5	1–30
3411	² Трава	<i>Corynebacterium</i> sp.	80	120	0–2.5	1–30
3194	¹ Чёрный лишайник	<i>Micrococcus</i> sp.	105	360	0–7.5	5–30
3398	Биоплёнка на скале	<i>Micrococcus</i> sp.	70	270	0–5	1–30
Дрожжи						
36с	Почва на скале	³ угольно-чёрные	140	600	0–15	5–30
237	Почва глинистая	³ угольно-чёрные	170	650	0–15	5–30
2299	Почва	³ угольно-чёрные	200	800	0–15	5–30
14с	Лишайник	красные	150	1100	0–10	1–37
33с	Почва под мхом	красные	280	1200	0–10	1–37
48с	Почва под мхом	красные	180	900	0–10	1–37
182с	¹ Чёрный лишайник	красные	250	1200	0–15	1–37
11р.1	Тёмно-зелёный мох	белые	100	240	0–10	1–30
11р.2	Тёмно-зелёный мох	белые	100	250	0–10	1–30

Примечания: ^{1,2}Изолированы из экосистем: ¹чёрные лишайники на вертикальных скалах (клифах), ²трава *Decshampcia antarctica*. ³Угольно-чёрные дрожжи – *Exophiala nigra*.

Стратегия выживания микроорганизмов в экстремальных условиях Антарктики, в частности при высоком уровне солнечного излучения, может обеспечиваться несколькими способами: (1) механизмами, которые минимизируют клеточные повреждения; (2) системами репарации, которые устраняют повреждения ДНК. Минимизация повреждений может происходить за счёт пигментов (меланинов и каротиноидов). Известно, что эти пигменты являются эффективными антиоксидантами, которые обезвреживают токсичные формы кислорода, образующиеся при различных видах радиации. Так, например, пигментированные дрожжи были более устойчивы к УФ, чем белые (табл.). У бактерий такая зависимость не выявлена:

высокую устойчивость к УФ проявили как непигментированные штаммы *Micrococcus* sp., так и оранжевые штаммы *Cryobacterium* sp. или розовые штаммы *Methylobacterium* sp. (табл.). Видимо, при отсутствии пигментов бактерии реализовали другие системы защиты.

Для устранения повреждений ДНК, которые возникают при различных типах радиации, в том числе и при солнечном коротковолновом УФ излучении, наиболее важным является наличие у клеток эффективных систем репарации повреждений ДНК. Такое направление стратегии выживания используют экстремально радиорезистентные бактерии (например, *Deinococcus radiodurans*) [5]. Как нами показано, антарктические бактерии и дрожжи характери-

зуются высокими пороговыми дозами УФ, а чем больше пороговая доза УФ, тем выше способность бактерий к репарации. Анализ дозовых кривых выживаемости антарктических штаммов после УФ облучения (рис. 2) показал, что их резистентность к УФ, вероятно, обусловлена наличием активных систем репарации 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 температу-

ре [1].

Мы считаем маловероятным, 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°C), и которые имели эффективные механизмы репарации клеточных повреждений (в частности, повреждений ДНК), и/или пигменты (каротиноиды и меланины).

Выводы

Стратегия выживания микроорганизмов в экстремальных условиях Антарктики направлена на природную селекцию микроорганизмов, которые изначально были устойчивы к высокому уровню УФ радиации, а также на естественный отбор психрофильных/психротолерантных бак-

терий и дрожжей. Представленные данные позволяют предположить, что первопричиной формирования и эволюции микробных сообществ в Антарктике послужили низкая температура, высокий уровень УФ, а также географическая изоляция островов.

Литература

1. Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. – Санкт-Петербург: Изд. С.-Петербургского ун-та, 2007. – 299 с.
2. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Гладка Г.В. Распространение психрофильных микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики // Микробиол. журнал. – 2012. – Т. 74, №1. – С. 3–8.
3. 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. – Т. 73, № 3. – С. 3-8
4. 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. – Т. 72, № 2. – С. 4-11
5. Daly M.J., Minton K.W. Resistance to radiation // Science. – 1995. – Vol. 270, № 24. – P. 1318.

TASHYREV A., GLADKA G., ROMANOVSKAYA V.

*Institute of Microbiology and Virology of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, D 03680, Kyiv, Zabolotny str., 154 e-mail: victoriaroman@ukr.net*

EVOLUTIONARY ECOLOGY and STRATEGY of SURVIVAL of ANTARCTIC MICROORGANISMS in EXTREME CONDITIONS

Aims. Microorganisms live in ecosystems of Antarctic in extreme conditions: low temperature, a high level of a solar radiation and the raised mineralization in coastal regions. In this connection ecophysiological properties of the bacteria isolated from soils, biofilms on rocks and phytocenosis of Antarctic have been studied. **Methods.** The aerobic microorganisms isolated earlier at 1–5°C and 30°C from various ecosystems of Antarctic have been studied. Resistance to UV radiation, psychro- and halotolerance have been defined by standard methods. **Results.** It is shown that Antarctic bacteria are presented: (1) psychrophilic and psychrotolerant bacteria (grow in a range 1–20°C or 1–30°C); (2) moderate halophiles (*Halomonas* sp. and *Cryobacterium* sp.), resistant to 10–15% NaCl; (3) UV-resistant bacteria. Strains *Micrococcus* sp. 3194, 3398, *Methylobacterium* sp. 3294, 3392 and *Cryobacterium* sp. 3179 were most resistant to UV (LD_{99,99} compounded 210–360 J/m²). It is not revealed psychrophilic yeast from the same ecosystems, but all were psy-

chro- and halotolerant (grew in a range 1-30°C and 10-15% NaCl). Pigmented strains of yeast (black and red) were highly resistant to UV ($LD_{99,99}$ compounded 600-1200 J/m²), while for white yeast $LD_{99,99} = 250$ J/m². **Conclusions.** Strategy of a survival of microorganisms in Antarctic is directed on natural selection and sampling of microorganisms which initially were psychrotolerant and UV-resistant. If to take into consideration aerosol, ornithogenic and anthropogenic transfer of a microflora to Antarctic, the presented data allows to assume that the low temperature, high level UV, and also geographical isolation of islands are the primary cause for formation and evolution of microbic communities in Antarctic.

Key words: strategy of survival, antarctic bacteria/yeast, resistance to UV, psychrotolerance, halotolerance, evolution.

FOMINA M.O.

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St. 154, e-mail: mfomina55@gmail.com

PHYLOGENETIC FINGERPRINTING OF MICROBIAL COMMUNITIES IN METAL POLLUTED SOILS USING RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS (RISA)

Introduction

Soils constantly act as a sink for many hazardous contaminants and maintaining soil fertility and health is a big challenge. Hence, protecting the diversity of microbial communities is an important part of soil conservation. Microbial communities are among the most important soil components playing a key role in, e.g. nutrient cycling, plant symbioses, decomposition, metal and mineral transformations, and other critical ecosystem processes. In particular, fungi are known to play fundamental biogeochemical roles in most terrestrial ecosystems and many can survive and grow under extreme conditions, and are capable of utilizing a large range of simple and complex organic substrates [1]. However, fungi have frequently been ignored or neglected in biodiversity conservation.

In this study, it was attempted to demonstrate the benefits of culture-independent PCR-based fin-

gerprinting technique called ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) in the examination of the effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) either alone or in combination with increasing concentrations of copper on fungal communities in soil microcosms.

Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) is a rapid and powerful tool for characterizing complex microbial communities and for detecting community composition changes in response to environmental disturbance [3]. Shifted RISA bands can be excised, cloned and sequenced to identify the populations involved in any community adaptations. This technique is based on gel separation of gene fragments by length differentiation of the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA in fungi.

Materials and Methods

The microcosms were designed to resemble the PAH and metal contaminated ecosystem by using sandy soil [pH 6.7 & water content 19% (w/w)]. The soil has no previous history of PAH and metal contaminations. Microcosms were prepared by weighing 50 g (dry weight) soil into glass jars (59 mm diameter, 98.5 mm height, Sigma, Germany). A 10 mm hole was made in polypropylene lid and this hole was plugged with a polyurethane foam stopper to allow air flow. Soil guideline of the Ministry of the Environment of the Province of Ontario (MOE) was used to spike soil samples (Pyrene: 250 mg/kg, copper: 300 mg/kg, *see* Table 1). 250 mg of pyrene (Sigma, Germany) was dissolved in analytical grade acetone (BDH, UK) and mixed with 50g of dried

sandy soil thoroughly by shaking vigorously. The soil samples were left for 2 hrs to evaporate acetone. Then cupric phosphate [Cu₃(PO₄)₂] was added to the soil. Water content was maintained at 19% by addition of sterile Milli-Q water as necessary. Microcosms were incubated in dark at 20°C. On Day 21 soil samples were taken for molecular characterization.

For RISA, 0.5 g aliquots of each soil sample were taken from each microcosm vessel in triplicate on day 21 and DNA was extracted by using an Ultra-Clean™ Soil DNA isolation kit (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. A purification procedure was performed by using a High Pure™ PCR product