

УДК 577.344 : 631.461

Е.М. Протасова¹, А.Ю. Максимов^{1,2}

¹ Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук,
Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский
университет, Пермь, Россия

ВЛИЯНИЕ КОГЕРЕНТНОГО УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 285 НМ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МУТАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ МОДЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследовано влияние когерентного ультрафиолетового излучения с длиной волны 285 нм на модельные культуры бактерий *Bacillus subtilis* и *Rhodococcus erythropolis*, обладающие активностью амилазы и нитриказы соответственно. Показано, что прямое облучение бактерий в течение 150 с вызывало в условиях эксперимента максимальный мутагенный эффект, который выражался в повышении количества диссоциантов (на 3 порядка) при достаточно высокой выживаемости клеток. При этом от 4,2 до 8,5 % диссоциантов составляли клоны с повышенной активностью целевых ферментов (амилазы *B. subtilis* и нитриказы *R. erythropolis*).

Ключевые слова: УФ-излучение, ДНК, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis*.

E.M. Protasova¹, A.Yu. Maksimov^{1,2}

² Perm State National Research university, Perm, Russia

EFFECT OF COHERENT UV RADIATION WITH A WAVELENGTH OF 285 NM ON THE VIABILITY AND MUTATION ABILITY OF MODEL MICROORGANISMS

The effect of coherent ultraviolet radiation with a wavelength of 285 nm on model cultures of bacteria *Bacillus subtilis* and *Rhodococcus erythropolis*, which have amylase and nitrilase activity, respectively, has been studied. It was shown that direct irradiation of bacteria for 150 sec under the experimental conditions caused the maximum mutagenic effect, which was expressed in an increase in the number of dissociants (by 3 orders of magnitude) with a sufficiently high cell survival. At the same time, from 4.2 to 8.5% of the dissociants were clones with increased activity of target enzymes (*B. subtilis* amylase and *R. erythropolis* nitrilase).

Keywords: UV radiation, DNA, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis*.

Ультрафиолетовое излучение является повсеместным фактором окружающей среды, обладающим широким кругом биологической активности. Известно ДНК-повреждающее действие ультрафиолета и связан-

ное с ним мутагенное действие. Известно, что различные длины волн ультрафиолетового диапазона вызывают разные типы повреждений ДНК. Так, диапазоны UVC (290-200 нм) и UVB (320-290 нм), но в гораздо меньшей степени UVA (320-400 нм), способны вызывать межмолекулярные и внутримолекулярные сшивки макромолекул – нуклеиновых кислот и белков, в том числе модифицировать молекулу ДНК, генерировать её фотопродукты.

Наиболее распространенными фотопродуктами ДНК, образующимися при ультрафиолетовом облучении, являются пиримидиновые димеры. Они генерируются при насыщении 5,6 двойных связей и образовании четырехчленного циклобутильного кольца и образуются во всех возможных дипиримидиновых сайтах, причем наиболее распространенным является тимин-тиминный димер (Т–Т), за которым следуют С–Т и Т–С димеры. С–С димеры являются наиболее редкими. Данные структуры являются непреодолимым препятствием для точного матричного копирования, на котором основано явление биологической жизни, и при отсутствии репарации ДНК летальны. Точная репарация УФ-повреждений ДНК с восстановлением исходной нуклеотидной последовательности зачастую невозможна, и в результате работы системы SOS-репарации целостность ДНК восстанавливается благодаря включению в цепь случайных нуклеотидов, что является основной причиной мутаций в живой природе [1, 2].

УФ-мутагенез давно применяется в селекции микроорганизмов и растений. Для биологической мутагенной активности УФ-излучения большое значение имеют дозирование и вклад разных частей спектра, а для эффективности селекции – баланс мутагенности и выживаемости облученных клеток, имеющих нелинейную зависимость от разных параметров облучения: спектрального состава, интенсивности, временного режима обработки, сочетания световых и темновых фаз при периодическом режиме облучения. Однако традиционно используются УФ-источники с широким спектром излучения – от жесткого ультрафиолета до видимой части спектра с различной интенсивностью составляющих, зависящей от конкретного источника или серии ламп. В связи с этим точно стандартизовать методики использования УФ-мутагенеза было невозможно.

Кроме того, известно, что ультрафиолет обладает широким спектром фитостимулирующего действия. Показано, что облучение UVA приводит к увеличению площади листьев и веса в свежем виде [3], на разных модельных растительных культурах обнаружено стимулирую-

щее действие ближнего ультрафиолета на морфогенез, количество междоузлий, площадь листовых пластинок [4–6]. Также UVA увеличивает массу корней в условиях засухи [7]. Показано стимулирующее действие UVA и UVB на многие физиологические процессы, повышение уровня биосинтеза флавоноидов и других полифенольных соединений [8–10]. Однако большинство таких исследований сделано на широковолновых источниках со сложным составом спектра. Вклад в такие процессы отдельных узких спектральных зон остается невыясненным.

В настоящее время в связи с развитием лазерной и светодиодной техники появилась возможность исследования влияния когерентных источников с узким пиком (диапазоном) излучения для дифференцированного определения биологической активности конкретных диапазонов, а также разработки дозированного применения источников для достижения более воспроизводимого, стандартизуемого и прогнозируемого эффекта.

Объекты и методы исследования. Исследовано влияние на бактериальные культуры светодиодного источника с длиной волны 285 нм, относящейся к UVB диапазону. Данные о биологической активности излучения данного волнового диапазона немногочисленны. Модельными объектами исследования были грамположительные бактерии: грамположительная спорообразующая культура бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633, обладающая активностью фермента амилазы, а также мезофильный штамм *Rhodococcus erythropolis* NG28, обладающий высокой нитрильной активностью. Исследованы выживаемость клеток при различных режимах УФ-облучения светодиодом с длиной волны 285 нм при прилагаемой мощности 5 мВт, а также частота диссоциации культуры и появления бактерий с повышенной активностью.

Культуру с концентрацией 10^{10} клеток в 1 мл обрабатывали в культуральном 12-луночном планшете в течение разных периодов времени (5, 10, 30, 60, 90, 150, 300, 600 с) с расстояния 5 см. Затем проводили серию 10-кратных разведений обработанной суспензии, и из 2, 4 и 6 разведений проводили высев в количестве 100 мкл газоном на чашки Петри с агаризованной средой. Культивирование проводили при температуре 30 °С в течение 48 ч на агаризованной минимальной среде с добавлением крахмала в качестве источника углерода для *B. subtilis* ATCC 6633 и глюкозы для *R. erythropolis* NG28. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Для оценки выживаемости бактерий подсчитывали число выросших колоний (в млн/мл при разведении 10^{-2}). Поскольку у исследуемых культур отсутствуют специальные генетические маркеры, но они склон-

ны к генетической диссоциации, выраженной в появлении колоний крупного размера с менее плотной консистенцией, для оценки мутагенного потенциала исследуемых бактерий подсчитывали среднее количество диссоциантов на 1000 колоний.

Результаты исследования. Исследовано влияние УФ 285 нм на количество КОЕ/мл (1, 2) и количество диссоциантов на 1000 КОЕ (3, 4) грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *R. erythropolis* NG28 (рис. 1).

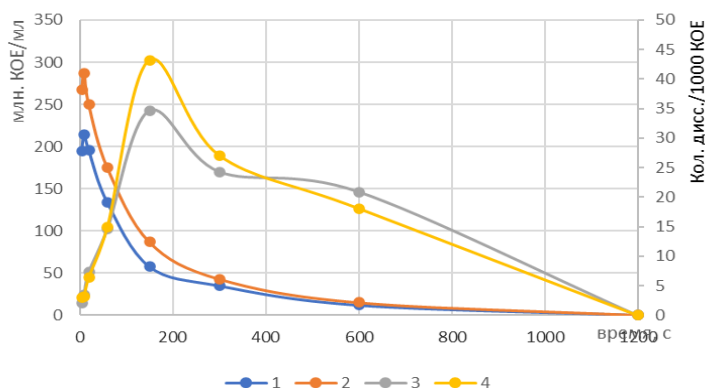


Рис. 1. Влияние облучения источником УФ 285 нм на КОЕ (1, 2) и количество диссоциантов на 1000 КОЕ (3, 4) грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 (линии 1 и 3) и *R. erythropolis* NG28 (линии 2 и 4)

Установлено, что облучение в течение 10 минут (600 с) вызывало гибель более 95 % бактерий обеих культур относительно исходного количества в суспензии.

В то же время кратковременное облучение в течение 10 с оказывало стимулирующее действие на выживаемость бактерий и повышало количество колоний до 7 % относительно контрольного необлученного варианта. По-видимому, увеличение КОЕ в этом случае связано со стимулированием роста покоящихся клеток *R. erythropolis* и спор *B. subtilis*. Таким образом, количество КОЕ в условиях данного эксперимента было максимальным в вариантах, облученных в течение 10 с. В то же время ранее нами было установлено, что облучение в течение 10 с также стимулирует общую активность бацилл. В дальнейшем при увеличении времени облучения количество жизнеспособных клеток экспоненциально снижалось.

Исследованы амилолитическая активность выборки диссоциантов культуры *B. subtilis* ATCC 6633 и нитрилазная активность диссоциантов *R. erythropolis* NG28. Показано, что во всех вариантах от 4,2 до 8,5 % диссоциантов составляли клоны с повышенной активностью целевых ферментов (амилазы *B. subtilis* ATCC 6633 и нитрилазы *R. erythropolis* NG28). Диссоциант *B. subtilis* ATCC 6633 с максимальной активностью амилазы (3,74 мкмоль/мин/мг сухого веса клеток – на 56 % выше, чем у контрольных вариантов) был выделен из образца, облученного в течение 30 с. Диссоциант *R. erythropolis* NG28 с максимальной нитрилазной активностью (12,83 мкмоль/мин/мг сухого веса клеток – на 68 % выше, чем у контрольных вариантов) был выделен из суспензии, облученной в течение 60 с.

Таким образом, показана возможность использования излучения в качестве фактора мутагенеза и повышения генетического разнообразия в целях селекции микроорганизмов–продуцентов биотехнологически значимых ферментов.

Список литературы

1. Jonczyk P., Fijalkowska I., Ciesla Z. Overproduction of the subunit of DNA polymerase III counteracts the SOS-mutagenic response of *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85. – P. 2124–2127.
2. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis / A. Maor-Shoshani, N.B. Reuven, G. Tomer, Z. Livneh // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 565–570.
3. Effect of supplemental UV-A irradiation in solid-state lighting on the growth and phytochemical content of microgreens / A. Brazaitytė [et al.] // Int. Agrophysics. – 2015. – Vol. 29.1. – P. 13–22.
4. Biswas D.K., Marcel A.K. Jansen. Natural variation in UV-B protection amongst *Arabidopsis thaliana* accessions // Emirates J. Food Agriculture. – 2012. – Vol. 24.6. – P. 621.
5. Chang Ch.-L., Kuang-Pi Ch. The growth response of leaf lettuce at different stages to multiple wavelength-band light-emitting diode lighting // Scientia Horticulturae. – 2014. – Vol. 179. – P. 78–84.
6. Solar ultraviolet radiation exclusion increases soybean internode lengths and plant height / Zhang, Lingxiao [et al.] // Agricultur. Forest Meteorology. – 2014. – Vol. 184. – P. 170–178.
7. Interactive effects of UV radiation and water availability on seedlings of six woody Mediterranean species / M. Bernal, L. Llorens, J. Badosa, D. Verdaguer // Physiol. Plant. – 2013. – Vol. 147. – P. 234–247.

8. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase / B.G. Kim, J.H. Kim, J. Kim, C. Lee, J.H. Ahn // *Mol Cells*. – 2008. – Vol. 25(2). – P. 247–252.

9. Isoflavone accumulation and the metabolic gene expression in response to persistent UV-B irradiation in soybean sprouts / Y.J. Lim, H.Y. Jeong, C.S. Gil, S.J. Kwon, J.K. Na, C. Lee, S.H. Eom // *Food Chem.* – 2020. – Vol. 15;303:125376. DOI: 10.1016/j.foodchem. 2019.125376.900.

10. Effects of UV-A radiation on organ-specific accumulation and gene expression of isoflavones and flavonols in soybean sprout / Y.J. Lim, J.I. Lyu, S.J. Kwon, S.H. Eom // *Food Chem.* 2021. – Vol. 339:128080.

References

1. Jonczyk P., Fijalkowska I., Ciesla Z. Overproduction of the subunit of DNA polymerase III counteracts the SOS-mutagenic response of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, pp. 2124-2127.

2. Maor-Shoshani A., Reuven N.B., Tomer G., Livneh Z. Highly mutagenic replication by DNA polymerase V (UmuC) provides a mechanistic basis for SOS untargeted mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2000, 97, pp. 565-570.

3. Brazaitytė A. et al. Effect of supplemental UV-A irradiation in solid-state lighting on the growth and phytochemical content of microgreens. *Int. Agrophysics*, 2015, vol. 29.1, pp. 13-22.

4. Biswas D.K., Marcel A.K. Jansen. Natural variation in UV-B protection amongst *Arabidopsis thaliana* accessions. *Emirates J. Food Agriculture*, 2012, vol. 24.6, 621 p.

5. Chang Ch.-L., Kuang-Pi Ch. The growth response of leaf lettuce at different stages to multiple wavelength-band light-emitting diode lighting. *Scientia Horticulturae*, 2014, vol. 179, pp. 78-84.

6. Lingxiao Zhang et al. Solar ultraviolet radiation exclusion increases soybean internode lengths and plant height. *Agricultur. Forest Meteorology*, 2014, vol. 184, pp. 170-178.

7. Bernal M., Llorens L., Badosa J., Verdaguer D. Interactive effects of UV radiation and water availability on seedlings of six woody Mediterranean species. *Physiol. Plant.*, 2013, vol. 147, pp. 234-247.

8. Kim B.G., Kim J.H., Kim J., Lee C., Ahn J.H. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction

of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase. *Mol Cells.*, 2008, vol. 25 (2), pp. 247-252.

9. Lim Y.J., Jeong H.Y., Gil C.S., Kwon S.J., Na J.K., Lee C., Eom S.H. Isoflavone accumulation and the metabolic gene expression in response to persistent UV-B irradiation in soybean sprouts. *Food Chem.*, 2020, vol. 15, 303, 125376. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125376.900

10. Lim Y.J., Lyu J.I., Kwon S.J., Eom S.H. Effects of UV-A radiation on organ-specific accumulation and gene expression of isoflavones and flavonols in soybean sprout. *Food Chem.*, 2021, vol. 339, 128080.

Сведения об авторе

ПРОТАСОВА Е.М.

e-mail: 19mochalova96@mail.ru

Младший научный сотрудник лаборатории агробиофотоники ПНИИСХ – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Пермь, Россия

МАКСИМОВ А.Ю.

e-mail: almaks1@mail.ru

Кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь, доцент кафедры микробиологии и иммунологии и кафедры биохимии и медицинской биотехнологии ПГНИУ, Пермь, Россия

About the author

PROTASOVA E.M.

e-mail: 19mochalova96@mail.ru

Junior Researcher, Laboratory of Agrobiophotonics, Perm Research Institute of Agriculture, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (PFRC UB RAS), Perm, Russian Federation

MAKSIMOV A.Yu.

e-mail: almaks1@mail.ru

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Biotechnology of the IEGM Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (PFRC Ural Branch of the Russian Academy of Sciences), Perm, Associate Professor of the Department of Microbiology and Immunology and the Department of Biochemistry and Medical Biotechnology of Perm State University, Perm, Russian Federation

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад автора: авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Получена: 04.04.2023

Одобрена: 09.04.2023

Принята к публикации: 14.04.2023

Conflict of Interest: the authors declare no conflict of interest.

Author Contributions: all authors have made an equivalent contribution to the publication.

Received: 04/04/2023

Approved: 09/04/2023

Accepted for publication: 14/04/2023

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Протасова, Е.М. Влияние когерентного УФ-излучения с длиной волны 285 нм на жизнеспособность и мутационную способность модельных микроорганизмов / Е.М. Протасова, А.Ю. Максимов // Прикладная фотоника. – 2023. – Т. 10, № 3. – С. 44–51.

Please cite this article in English as: E.M. Protasova, A.Yu. Maksimov. Effect of coherent UV radiation with a wavelength of 285 nm on the viability and mutation ability of model microorganisms // Applied photonics, 2023, no. 3, pp. 44-51.