

## Uticaj UV-C zraka na preživljavanje, rast i produkciju melanina kod soja *Bacillus thuringiensis*

---

*Primenom spektrofotometrijskog i metoda razređenja ispitan je uticaj sukcesivnih tretmana UV-C zračenja na preživljavanje, rast i produkciju melanina soja Bacillus thuringiensis. Dobijeni rezultati pokazuju da ovaj tip zračenja deluje negativno na dati soj. Negativno dejstvo UV-C zračenja se ogleda u smanjenom preživljavanju u odnosu na rastući broj tretmana. Zabeležen je i brži rast sa izuzetkom nakon trećeg tretmana zračenjem. Pored toga, detektovana je promenljiva produkcija melanina.*

---

### Uvod

UV zračenje deluje negativno na mikroorganizme. Njegovo dejstvo se ogleda u inhibiranju njihovog rasta odnosno metaboličkih procesa (Jemcev i Đukić 2000; Knežević-Vukčević i Simić 1997). UV-C zračenje talasne dužine od 200 do 290 nm deluje mutageno i letalno na mikroorganizme (Jemcev i Đukić 2000). Ovo zračenje može indukovati stvaranje slobodnih radikala u ćeliji. Slobodni radikali reaguju sa makromolekulima u ćeliji i inaktivišu ih (Chen *et al.* 2004). Glavni mehanizam koji uslovljava letalni i mutageni efekat je stvaranje pirimidinskih dimera na DNK lancu čiji nastanak ometa normalnu replikaciju i transkripciju DNK (Jemcev i Đukić 2000). Ukoliko greške na lancu DNK ostanu fiksirane i u narednoj generaciji, može se govoriti o nastanku mutanata.

Da bi se dejstvo UV-C zraka označilo kao smrtonosno, rezultat zračenja mora biti stvaranje većeg oštećenja na DNK nego što ćelija može da popravi (Wesley i Margaret 1988). Međutim, ćelije su razvile mehanizme kojima popravljaju oštećenu DNK. Mehanizmi za reparaciju oštećene DNK su često

genetički uslovljeni. Pojedini pigmenti mogu imati ulogu zaštitnih sistema od negativnog dejstva UV zračenja (Jemcev i Đukić 2000). U tu grupu pigmentata spada melanin (Zhang *et al.* 2007). Prethodna istraživanja su pokazala da mnogi sojevi *B. thuringiensis* imaju sposobnost da uz prisustvo tirozina u sredini sintetišu melanin (Ruan *et al.* 2004; Santos i Stephanopoulos 2008; Zhang *et al.* 2007).

**Cilj** ovog rada je ispitivanje uticaja sukcesivnog tretmana UV-C zračenjem na soj *B. thuringiensis*. Definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

- utvrđivanje i praćenje preživljavanja soja *B. thuringiensis* pri sukcesivnom izlaganju određenim dozama UV-C zraka;
- praćenje rasta datog soja bakterija, prethodno izloženog UV-C zračenjem;
- utvrđivanje i praćenje produkcije melanina tokom tretmana UV-C zračenjem;
- poređenje dobijenih rezultata.

### Materijal i metode

Ispitivanje uticaja UV-C zračenja na soj *B. thuringiensis* se sastojalo iz dva dela. U prvom delu ispitan je uticaj sedam različitih doza na preživljavanje soja *B. thuringiensis*. LB tečna hranljiva podloga (1% kazein hidrolizat, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 1000 mL destilovane H<sub>2</sub>O) sa datom prekonocnom kulturom je centrifugirana 15 min. na 2500 rpm. Zatim je talog resuspendovan u 0.01 M rastvoru MgSO<sub>4</sub>. Nakon toga Petri-kutije sa ispitanim sojem bakterija u rastvoru 0.01 M MgSO<sub>4</sub> su izlagane zracima UV-C (254 nm) lampe snage 30 W u intervalima od 5 do 35 s sa vremenskom razlikom od 5 s između tretmana. Kao negativna kontrola korišćena je kultura koja nije izlagana

---

*Marjan Biočanin (1991), Beograd, Ilije Stojadinovića 8, učenik 4. razreda XIII beogradske gimnazije*

*MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog, XII beogradska gimnazija*

UV-C zračenju. Nakon 12 h inkubacije primenom spektrofotometrijske metode na talasnoj dužini 600 nm očitane su vrednosti apsorbanca bakterijskih suspenzija. Na osnovu vrednosti apsorbanca odabrana je jedna doza UV-C zračenja za dalje ispitivanje.

U narednom delu istraživanja ispitan je uticaj prethodno odabrane doze zračenja na preživljavanje, rast i produkciju melanina soja *B. thuringiensis*. Ponovljen je proces pripreme prekonoćne kulture za zračenje. Nakon zračenja uzorak je prebačen u LB podlogu sa dodatkom L-tirozina (0.05%) radi praćenja rasta i produkcije melanina. U određenim vremenskim intervalima (0, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 minuta) na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 600 nm očitavana je apsorbanca bakterijskih suspenzija. Pored toga, metodom razređivanja su zasejani ispitivani sojevi. Kao negativna kontrola korišćen je soj bakterija koji nije izlagan UV-C zracima.

Kulture bakterija iz eksponencijalne faze rasta su prebačene u LB podlogu sa dodatkom tirozina. Zračene kulture iz eksponencijalne faze su pripremljene za naredni tretman zračenja. Celokupan proces je ponovljen još četiri puta. Nakon 24 h izbrojane su razvijene kolonije. Broj kolonija je iskorišćen za računanje broja ćelija po mL podloge (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Nakon petog tretmana zračenjem bakterije su bojene po Gramu radi morfološkog poređenja sa bakterijama koje nisu tretirane zračenjem.

Brojčane vrednosti dobijene očitavanjem podataka sa spektrofotometra i računanjem broja ćelija po mL podloge upotrebljene su za konstruisanje krive rasta. Broj ćelija nultog minuta tj. odmah nakon ozračivanja je iskorišćen za konstruisanje krive preživljavanja. Takođe, broj ćelija po mL podloge između dva vremenska intervala je iskorišćen za određivanje vremena generacije. Vreme generacije se može izračunati preko sledeće formule:

$$T = \frac{t \cdot \log 2}{\log X_t - \log X_0}$$

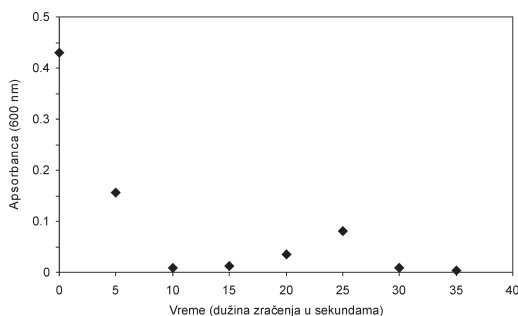
gde  $X_0$  predstavlja broj ćelija prvog vremenskog intervala,  $X_t$  broj ćelija drugog vremenskog intervala, a  $t$  vreme između  $X_0$  i  $X_t$  (Knežević-Vukčević i Simić 1997).

Pored rasta praćena je i produkcija melanina. Naime, 20 h nakon ozračivanja hranljiva podloga sa sojem *B. thuringiensis* je centrifugirana 15 min na 2500 rpm. Nakon toga primenom spektrofotometrijske metode na talasnoj dužini od 400 nm izme-

rena je apsorbanca supernatanta (Zhang *et al.* 2007). Merenja vezana za produkciju melanina su ponavljana nakon svakog tretmana zračenjem.

## Rezultati i diskusija

Rezultati prvog dela istraživanja su prikazani na slici 1. U intervalu od 0 do 15 sekundi primećuje se da sa porastom dužine zračenja opada apsorbanca tj. brojnost ćelija. Pri ozračivanju dužine 20 i 25 s se beleži rast apsorbanca. Ova pojava je verovatno posledica aktivacije i uspešnih reparacija pri izlaganju pomenutim dozama UV-C zračenja. Nakon 25 sekundi apsorbanca ponovo opada. Za dalje ispitivanje odabrana je dužina zračenja od 25 sekundi.



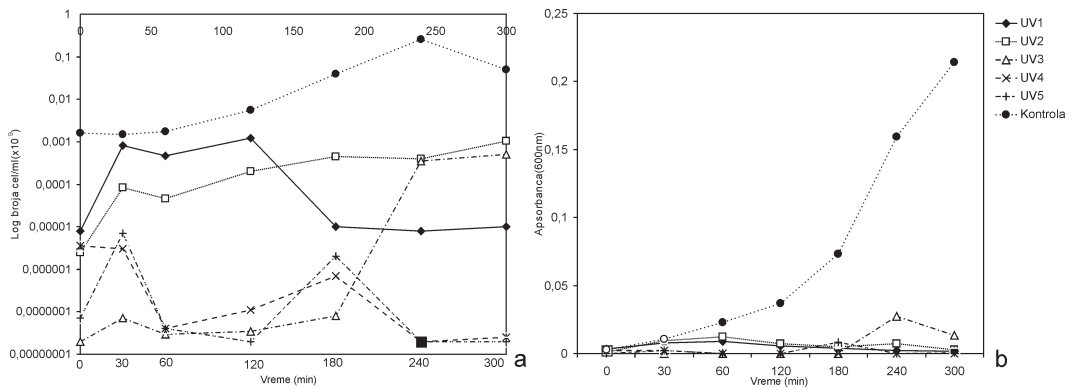
Slika 1. Apsorbanca ozračenog soja *B. thuringiensis* u zavisnosti od dužine zračenja

Figure 1. Absorbance of *B. thuringiensis* strain at different irradiation times (shown in seconds)

Na slikama 2a i 2b prikazan je rast UV tretiranog soja *B. thuringiensis*. Sa povećanjem broja tretmana UV-C zračenja beleži se manji broj ćelija po mL podloge u odnosu na kontrolni soj. Sa povećanjem broja tretmana UV-C zračenja opada i preživljavanje (slika 3a).

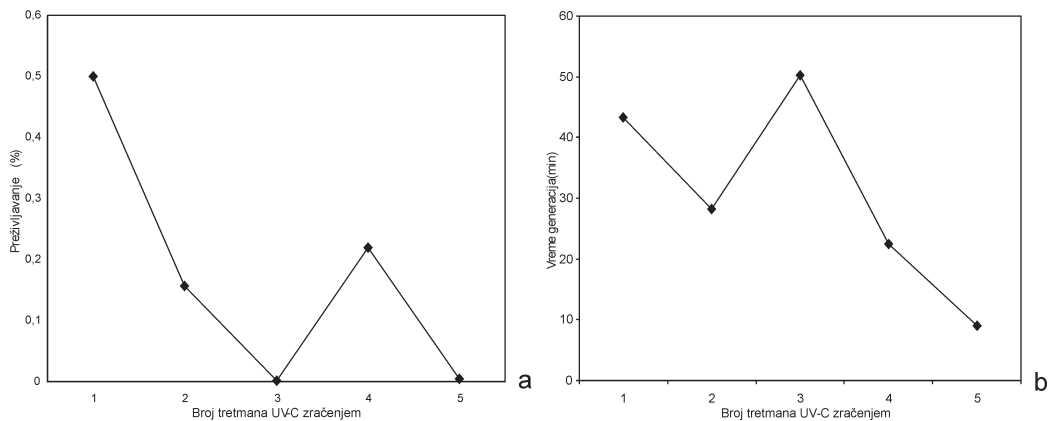
Ovi podaci idu u prilog tvrdnji da su mutanti znatno osetljiviji na dejstvo mutagenih agenasa za razliku od kultura koje nisu izlagane dejstvu istih (Knežević-Vukčević *et al.* 2009). Niske apsorpcione vrednosti (slika 2b) su posledica velike smrtnosti ćelija indukovane UV-C zračenjem.

Pored niskih vrednosti zabeležene su i vrednosti apsorbanca jednake nuli. Ove vrednosti su verovatno posledica prisustva spora *B. thuringiensis* u ispi-



Slika 2. Broj ćelija *B. thuringiensis* tretiranih UV-C zracima (a) i apsorbance na 600 nm (b) u zavisnosti od vremena

Figure 2. Number of cells per mL of nutrient media (a) and absorbances at 600 nm (b) as a function of time (shown in minutes). The control group is represented with the black circle.



Slika 3. Udeo preživelih ćelija u procentima (negativna kontrola – 100%) (a) i vremena generacija (b) u zavisnosti od broja tretmana UV-C zračenjem

Figure 3. Cell survival percentage (negative control – 100%) (a) and generation times (b) as a function of the number of UV-C treatments

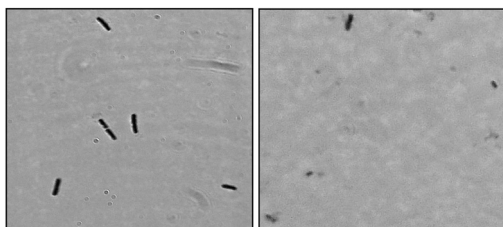
tivanom uzorku (Bhatta *et al.* 2007; Vary i Halvorson 1965). U nepovoljnim situacijama *B. thuringiensis* prelazi u stanje endospora. Vary i Halvorson (1965) svojim istraživanjem pokazuju da je moguće da ćelije sporulišu još u prvih 25 sekundi, tokom trajanja tretmana UV-C zračenjem. Samim tim rezistentnost endospora na dejstvo ultravioletnog zračenja je 10-50 puta viša (Nicholson *et al.* 2000). Prethodna istraživanja su pokazala da prisustvo melanina u ćeliji smanjuje UV indukovanu ina-

ktivaciju ćelija (Chen *et al.* 2004). Međutim, odgovor za opadajuće preživljavanje verovatno može biti i u jačini doze tj. dužini tretmana zračenjem.

Prateći rast (slike 2a, 2b i 3b), vidi se brži rast sa povećanjem tretmana. Pored toga, primećuje se dosta slabiji rast nakon trećeg tretmana. To može biti posledica lošeg odabira bakterijskih kultura za pripremu trećeg tretmana. Sa druge strane, ova pojava može biti i posledica pada tolerancije na oštećenja prouzrokovanih zračenjem. Pored mnogih repa-

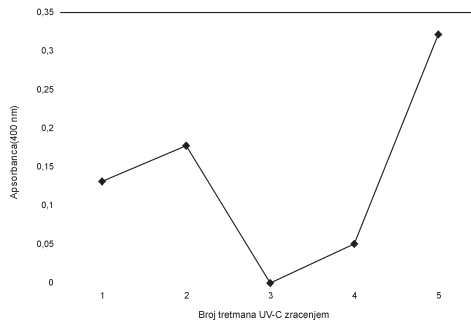
racionalnih mehanizama ćelije sadrže i mehanizme koji omogućavaju toleranciju oštećenja genetičkog materijala. Većoj toleranciji doprinosi SOS odgovor na račun veće mutagenoze (Knežević-Vukčević *et al.* 2009). Postoji mogućnost da je nakon prva tri tretmana tolerancija opala tako da su nakon trećeg tretmana preživljavanje i rast izuzetno oslabili, odnosno usporili. SOS odgovor favorizuje preživljavanje populacije bakterija izloženih dejstvu UV-C zraka tako što povećava genetičku varijaciju unutar same populacije. Kapacitet za nastavak reparacije u prisustvu oštećenja može biti koristan za jednocelijske organizme u evolucionom smislu (Knežević-Vukčević *et al.* 2009). To znači da postoji mogućnost da je nakon četvrtog tretmana došlo do selekcije unutar populacije. Određeni deo bakterijskih ćelija je nakon nekoliko uspešnih deoba uginuo, što se može videti na slici 2a (UV4). Zahvaljujući genetičkoj varijabilnosti unutar populacije deo bakterija sa mogućnošću bržeg razmnožavanja je preživeo. Nakon petog tretmana, vreme generacije (slika 3b) se smanjuje, odnosno brzina razmnožavanja se povećava. Da bi se sa sigurnošću tvrdilo da vreme generacije opada sa povećanjem tretmana neophodno je ponoviti tretmane UV-C zračenjem još nekoliko puta, gde bi se pratio rast datog soja.

Na slici 4 prikazane su ćelije *B. thuringiensis* pre tretmana (levo) i nakon petog tretmana (desno) UV-C zračenjem. Primećeno je da su ćelije pre zračenja dosta krupnije u odnosu na one koje su tretirane zračenjem. Takođe je zapažen veći broj ćelija po vidnom polju u uzorku koji nije tretiran zračenjem.



Slika 4. Kontrolni mikroskopski preparat *B. thuringiensis* (levo) i mikroskopski preparat *B. thuringiensis* nakon petog tretmana UV-C zračenjem (desno)

Figure 4. Control microscopic sample *B. thuringiensis* (left) and microscopic sample *B. thuringiensis* after fifth UV-C treatment (right)



Slika 5. Produkcija melanina u zavisnosti od broja tretmana UV-C zračenjem

Figure 5. Change of melanin production after UV-C treatments

Pored praćenja rasta praćena je i produkcija melanina (slika 5). Prema podacima iz literature prisustvo melanina je uočljivo 20 h nakon početka rasta populacije sojeva *B. thuringiensis* (Ruan *et al.* 2004; Chen *et al.* 2004). Prateći produkciju melanina u zavisnosti od tretmana UV-C zračenjem vidi se da apsorbance raste između prva dva i između trećeg i petog tretmana. Nakon trećeg tretmana dolazi do naglog pada apsorbance. Objašnjenje za ovaj pad u produkciji melanina se verovatno podudara sa prethodno datim objašnjenjem o slabijem rastu kultura nakon trećeg tretmana zračenjem. Posledica promerljive produkcije melanina može biti i jačina doze zračenja. Naime, različiti sojevi vrste *B. thuringiensis* poseduju različite ćelijske kapacitete za produkciju melanina (Ruan *et al.* 2004). Postoji mogućnost da je odabrana dužina tretmana UV-C zračenja bila prejaka za praćenje sinteze melanina kod datog soja. Intezitet produkcije melanina jedne populacije bakterija takođe zavisi od hranljive podloge u kojoj se nalazi (Hoti i Balaraman 1993). Međutim, produkcija melanina, kao preživljavanje i rast, verovatno bi bili drugačiji da je u hranljivu podlogu ispitivanog soja *B. thuringiensis* dodat L-tirozin još pre prvog tretmana UV-C zračenjem.

## Zaključak

UV-C zračenje deluje negativno na soj *B. thuringiensis*. Negativan uticaj ove vrste zračenja se ogleda u sve manjem preživljavanju u odnosu na rastući broj tretmana. Sa povećanjem broja ponavljanja primećen je brži rast, sa izuzetkom nakon

trećeg tretmana zračenjem. Pored toga, detektovano je prisustvo melanina. Produkcija melanina je bila u porastu između prvog i drugog tretmana, kao i između trećeg i petog tretmana. Izuzetak je ponovo bio treći tretman zračenjem nakon koga nije detektovano prisustvo melanina kod soja *B. thuringiensis*. U budućim istraživanjima bilo bi interesantno proučavati uticaj nižih doza UV-C zraka pri većem broju sukcesivnih tretmana na produkciju melanina, preživljavanje i rast soja *B. thuringiensis*.

---

## Literatura

- Bhatta D., Christie G., Madrigal-Gonzalez B., Blyth J., Lowe C. R. 2007. Holographic sensors for the detection of bacterial spores. *Biosensors and Bioelectronics*, **23**: 520.
- Chen Y., Deng Y., Wang J., Cai J., Ren G.. 2004. Characterisation of melanin produced by wild-type strain of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **50**: 183.
- Hoti S. L., Balaraman K. 1993. Formation of melanin pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14. *Journal of General Microbiology*, **139**: 2365.
- Jemcev V., Đukić D. A. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojna knjiga
- Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji-prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B., Simić D. 2009. *Osnovi genetike prokariota*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Nicholson W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 548.
- Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P. 2004. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 286.
- Santos S. N. C., Stephanopoulos G. 2008. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 4.
- Vary J. C., Halvorson H. O. 1965. Kinetics of Germination of *Bacillus* Spores. *Journal Of Bacteriology*, **89**: 5.
- Wesley A. V., Margaret F. W. 1988. *Basic microbiology*. New York: Harper and Row
- Zhang J. T., Yan J. P., Zheng D. S., Sun Y. J., Yuan Z. M. 2007. Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, **105**: 151.

---

Marjan Biočanin

## Effect of UV-C Radiation on Survival, Growth and Melanin Production in *Bacillus thuringiensis*

The effects of successive treatments of UV-C radiation on survival, growth and melanin production of *Bacillus thuringiensis* strain were surveyed using spectrophotometry and pour plate technique. Results showed that this type of radiation has negative effects on survival of this strain. Bacterial cells after the fifth round of irradiation were significantly smaller than the ones which were not irradiated. Also, generation time decreases with an increase of the number of UV-C treatments. On the other hand, unsteady melanin production was detected. ☹