

ДРОЖЖИ В ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ СИБИРИ ПОЗДНЕПЛИОЦЕНОВОГО-РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВОГО ВОЗРАСТА

В. В. Дмитриев, Д. А. Гиличинский*, Р. Н. Файзутдинова,
Н. В. Остроумова*, В. И. Голубев, В. И. Дуда

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, 142292, Московская обл., г. Пушкино, Россия
* Институт почвоведения и фотосинтеза РАН, 142292, Московская обл., г. Пушкино, Россия

Жизнеспособные формы дрожжей были найдены в значительных количествах (до 9 тыс. колоний образующих единиц в 1 г сухого грунта) в мерзлых отложениях северо-востока Сибири позднеплиоценового-раннеплейстоценового возраста. Выделенные штаммы дрожжей отнесены к трем родам: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*. Свойства двух штаммов соответствовали современным видам *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner и *Sporobolomyces roseus* Kluyver et. van Niel. Штаммы дрожжей, отнесенные к роду *Rhodotorula*, близки к представителям видов *Rh. muscorum*, *Rh. fragariae* и *Rh. graminis*, но отличались от них по ряду таксономических признаков. Методом дифференциальной изотермической калориметрии обнаружена более высокая физиологическая активность дрожжей, выделенных из мерзлоты, по сравнению с их современными типовыми штаммами.

Дрожжи, вечная мерзлота, цито-физиологическая активность

YEASTS IN LATE PLIOCENE-EARLY PLEISTOCENE SIBERIAN PERMAFROST

V. V. Dmitriev, D. A. Gilichinsky*, R. N. Faizutdinova, N. V. Ostroumova*, V. I. Golubev, V. I. Duda

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the RAS, 142292, Pushchino, Moscow Region, Russia
* Institute of Soil Science and Photosynthesis of the RAS, 142292, Pushchino, Moscow Region, Russia

Appreciable (up to 9 thousand colony-forming units per 1 g absolutely dry ground) quantities of yeast were found in late Pliocene-early Pleistocene Siberian permafrost. The established yeast strains were attributed to three genera: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*. In their properties, two strains corresponded to species *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner and *Sporobolomyces roseus* Kluyver et. van Niel. Strains attributed to the genus *Rhodotorula* were similar to representatives of the species *Rh. muscorum*, *Rh. fragariae* and *Rh. graminis*. The method of differential isothermal calorimetry revealed a higher physiological activity of yeast isolated from permafrost compared to their modern relatives.

Yeast, permafrost, cyto-physiological activity

ВВЕДЕНИЕ

В литературе имеются достоверные данные о длительном сохранении жизнеспособных микробных клеток в некоторых криогенных образованиях: льды, вечномерзлые грунты и погребенные в них почвы [Абызов и др., 1993; Хлебникова и др., 1990], численность которых достигает значительных величин [Звягинцев и др., 1990]. Состав микроорганизмов весьма разнообразен: от неспороносных и спорообразующих бактерий, кокковидных форм — до актиномицетов, дрожжей и мицелиальных грибов [Звягинцев и др., 1985; 1990; Gilichinsky et al., 1994]. Сделан вывод, что в наиболее древних мерзлых породах и льдах сохраняются в жизнеспособном состоянии лишь прокариотные микроорганизмы, а предельный срок сохранения жизнеспособности эукариот (в частности, дрожжей) в этих ус-

ловиях составляет тысячи [Абызов и др., 1993] — десятки тысяч лет [Гиличинский и др., 1996]. В настоящей работе приводятся данные о количественном содержании дрожжей в мерзлых отложениях возрастом до 3 млн лет, цито-физиологических особенностях и систематическом статусе выделенных культур.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мерзлые образцы отобраны из керна скважин с глубин от 50 до 75,0 м в тундровой зоне Колымской низменности по профилю от р. Бол. Хомус-Юрхя на западе до р. Бол. Коньковая на востоке. Изучены низы широко известной в литературе олерской свиты и подстилающие ее томус-ярские пески. Подробная харак-

теристика отложений приведена ранее [Гуличинский и др., 1996].

Для обнаружения и выделения дрожжей были использованы 2 варианта сред: 1. СА+П-сусло-агар 7 (Б) + 0,1% пирувата натрия (w/v), pH 5,0; 2. YNB+П-yeast nitrogen base (Difco, USA) + 0,5% глюкоза + 0,1% пирувата натрия (w/v), pH 7,0 (использовалась как синтетическая среда). Глюкозу и пируват натрия стерилизовали отдельно в герметичных флаконах, закрытых в атмосфере азота, и добавляли после расплавления сред. Пируват, занимающий центральное положение в промежуточном метаболизме и служащий предшественником разнообразных продуктов, был добавлен с целью реактивации метаболических процессов у клеток, находящихся в заторможенном состоянии в условиях длительной криоконсервации. Посевы инкубировали при 16, 24 и 29°C.

Для выявления прокариотных микроорганизмов использовали крахмало-аммиачный агар — КАА [Никитин и др., 1966]. Температура культивирования 20°C. Пробы грунта растирали резиновым пестиком в стерильных фарфоровых ступках, вносили в колбы со стерильной водопроводной водой и взбалтывали в течение 10 мин [Никитин и др., 1966]. На агаризованные среды высевали пробы в разведениях 1:10 и 1:100 в пяти повторностях. В качестве контроля проводили холостые посевы стерильной водопроводной воды на 5 чашках с каждой средой. Опыты повторяли трижды. Использовали также способ учёта микроорганизмов по обрастанию комочков исходных грунтов, разложенных на поверхности агаризованных сред по методу, принятому в почвенной микробиологии [Никитин и др., 1966; Методы..., 1966]. Учет выросших колоний проводили при дифференцированном подсчете числа колоний различных фенотипов, принимая во внимание их форму, размеры, окраску, консистенцию и т. д. Для идентификации дрожжей использовали определители дрожжей [Barnett et al., 1983; Kreger, 1984].

Физиологическую активность дрожжей определяли методом дифференциальной изотермической калориметрии высокого разрешения на микрокалориметре „Биотест“ (Россия). Чувствительность прибора составляет 2,5 мВт, диапазон измерений 50—5000 мВт. Калориметрический блок состоит из двух эквивалентных по теплофизическим характеристикам камер (опыт и контроль). Рост культур проходил в стерильных микроаэрируемых условиях при постоянной температуре, поддерживаемой водным термостатом с точностью до 0,1°C. В качестве регистрирующего прибора использовали Logger CR 10; данные фиксировали с частотой 1 раз в 30 с. С помощью стандартного программного обеспечения данные из памяти Logger CR 10 пересылались в ПЭВМ и обрабатывались с помощью

стандартного пакета HARVARD GRAFICS. Для достижения хорошей воспроизводимости результатов особое внимание уделяли полной идентичности стартовых условий исследуемых культур (температура, оптическая плотность, объем посевного материала). Контроль за чистотой культур проводили методом фазово-контрастной микроскопии.

Для электронно-микроскопических исследований дрожжи фиксировали 2% глутаральдегидом в 0,05M какодилатном буфере, pH 7,2, затем в 2% OsO₄ в том же буфере, обезвоживали в этаноле, заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut E (Австрия), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособные бактерии были обнаружены практически во всех исследованных образцах (табл. 1). Дрожжи обнаружены в трёх из двенадцати образцов (в двух из четырех скважин): в двух образцах томус-ярской свиты и одном образце озерских отложений на глубинах 50, 60 и 62,2 м. Их численность составляет до 9,7 тыс. колониобразующих единиц (КОЕ) на 1 г сухого грунта (см. табл. 1). Прямой корреляции между численностью жизнеспособных дрожжей и бактерий в этих образцах не обнаружено. Дрожжи составляли до 0,2% от численности бактерий (см. табл. 1). При этом на чашках Петри при высеве 1 капли суспензии грунта (разведение 1:10) выросло в среднем от 5 колоний в образце № 12 до 50 — в образце № 11.

Корреляции между численностью жизнеспособных микроорганизмов и какими-либо физико-химическими свойствами грунтов выявить не

Таблица 1. Численность микроорганизмов в образцах (КОЕ: тыс./г абсолютно сухого грунта)

№ образца	Дрожжи		Бактерии	Дрожжи
	СА+П	YNB+П	КАА	%
1	0	0	55	0
2	0	0	0,5	0
3	1,2±0,7	0,9±0,6	740	0,2
4	0	0	—	0
5	0	0	1700	0
6	0	0	780	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0,2	0
9	0	0	0,2	0
10	0	0	920	0
11	9,7±0,6	9,2±3,8	8800	0,1
12	0,9±0,6	0,8±0,2	900	0,1

Примечание. КОЕ — колониобразующие единицы.

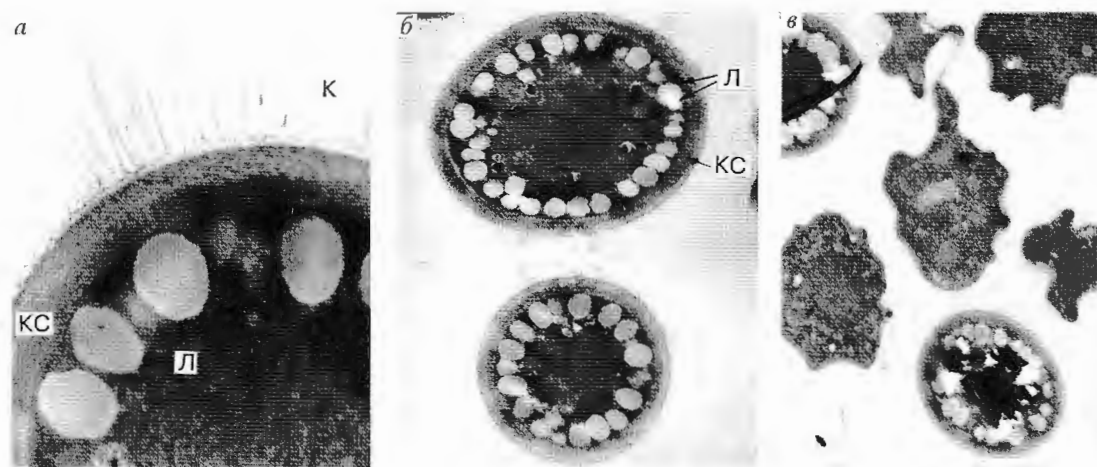


Рис. 1. Ультратонкие срезы дрожжей, выделенных из грунтов вечной мерзлоты:

а — *Cr. albidus*, фрагмент с характерной для базидиомицетов многослойной клеточной стенкой; б — периферическая локализация липидных гранул у *Cr. albidus*; в — полиморфизм *Cr. albidus*. Л — липидные гранулы, КС — клеточная стенка, К — капсула.

удалось. К тому же „стерильные“ и обсеменённые слои вечномёрзлых пород соседствуют, или сильно обсеменённые располагаются глубже слабо обсеменённых. Причины этого явления не ясны. Можно лишь предположить, что они могут быть связаны с особенностями дифференциальных режимов перехода различных горизонтов в вечномёрзлое состояние и очаговым распространением микроорганизмов.

Было выделено 10 штаммов дрожжей. Все они имеют ультраструктуру клеточных стенок ламеллярного типа (рис. 1, а), отличаются от обычных дрожжей сильным полиморфизмом (Рис. 1, в) и относятся к организмам базидиомицетного типа. Отличительной ультраструктурной особенностью этих дрожжей является наличие большего количества липидных гранул. У некоторых дрожжей, например, *Cr. albidus*, липиды могут располагаться по периферии цитоплазмы в виде плотно упакованных гранул (рис. 1, б), образуя как бы защитную „шубу“. Согласно морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам они идентифицированы как представители родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*. Диагностические характеристики выделенных культур криптококков и спороболомицетов полностью соответствуют видам *Cr. albidus* и *Sp. roseus* (табл. 2), тогда как по совокупности признаков штаммы рода *Rhodotorula* отличаются от современных описанных видов. Наиболее близки они к видам *Rh. muscorum*, *Rh. fragariae* и *Rh. graminis*. Сравнение полученных изолятов с типовыми штаммами этих видов выявило различия по способности к ассимиляции различных источников азота и углерода и росту в безвитаминной среде.

Проведен сравнительный анализ физиологической активности культур дрожжей, выделенных из грунтов вечной мерзлоты и их современных аналогов, взятых из коллекции микроорганизмов. Анализ термограмм кривых роста (рис. 2) показал, что скорость достижения максимальной активности у „мерзлотных“ дрожжей выше. Десятикратные повторы этих экспериментов, проведённые на культурах *Cr. albidus* подтвердили эту особенность. Аналогичные данные были получены на дрожжах рода *Rhodotorula*, а также в контрольных экспериментах с помощью спектрофотометрического метода.

В целом, состав дрожжевой биоты исследованных грунтов соответствует данным микробиологических анализов современных арктических тундровых почв, для которых характерно низкое видовое разнообразие и присутствие почти исключительно базидиомицетных дрожжей [Голубев, 1986]. Достоверность присутствия жизнеспособных дрожжей в наиболее древних отложениях вечной мерзлоты доказывается следующими данными:

Таблица 2. Штаммы дрожжей, выделенных из исследованных грунтов

№ образца	Роды и виды дрожжей	№ выделенных штаммов
3	<i>Cryptococcus albidus</i> (Satio) Skinner	С1
11	<i>Rhodotorula</i> sp.	R1, R2, R3
11	<i>Rhodotorula</i> sp.	R4, R5
11	<i>Rhodotorula</i> sp.	R6, R7
3, 12	<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluver et van Niel	Sp1, Sp2

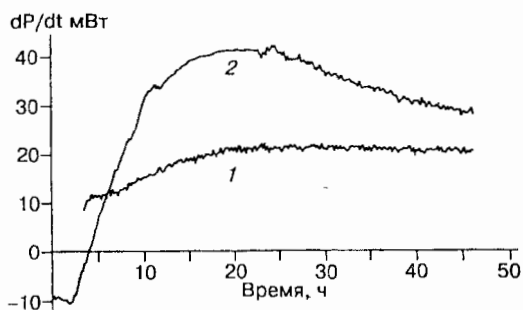


Рис. 2. Термограмма роста *Cryptococcus albidus* (температура культивирования +17,5°C):

1 — коллекционный штамм Y-2223 ВКМ; 2 — „мерзлотный“ штамм.

— большим числом жизнеспособных дрожжей в образцах, а не единичными клетками, что позволяло бы допускать возможность контаминации; полным отсутствием жизнеспособных дрожжей в вышерасположенных слоях вечной мерзлоты, что можно расценивать как важный дополнительный контроль чистоты экспериментов;

— специфичностью некоторых таксономических признаков ископаемых дрожжей, по сравнению с их современными представителями.

Присутствие жизнеспособных дрожжей в вечной мерзлоте позднелиценевого возраста, изменяет представление о длительности сохранения жизнеспособных форм эукариотных микроорганизмов в природных средах в условиях природной криоконсервации. Вопрос же о более длительном сохранении жизнеспособности эукариот остается пока открытым. Описанные цито-физиологические различия выделенных дрожжей по сравнению с современными штаммами, видимо, обусловлены адаптационными факторами. Пока неизвестно закреплены ли эти изменения генетически. В дальнейшем выделенные чистые культуры могут использоваться при решении вопросов эволюции микроорганизмов,

вызванных длительным пребыванием в условиях вечной мерзлоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (96-04-49530 и 95-04-11026а).

Литература

- Абызов С. С., Мицкевич И. Н. Микрофлора континентальных и морских льдов Антарктики // *Микробиол.*, 1993, т. 62, вып. 6, с. 994—1017.
- Голубев В.И. Дрожжи Арктической Восточно-Сибирской тундры // *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 1986, № 4, с. 609—612.
- Гиличинский Д. А., Воробьева Е. А., Соина В. С. и др. // *Микробиология вечной мерзлоты* // Тр. 1-го Съезда гео-криологов России. Ч. 1. М., Изд-во МГУ, 1996, с. 78—93.
- Звягинцев Д. Г., Гиличинский Д. А., Благодатский С. А. и др. Длительность сохранения микроорганизмов в постоянно-мерзлых осадочных породах и погребённых почвах // *Микробиол.*, 1985, т. 54, с. 155—161.
- Звягинцев Д. Г., Гиличинский Д. А., Хлебникова Г. М. и др. Сравнительная характеристика микробных сообществ многолетнемерзлых пород различного возраста и генезиса // *Микробиол.* 1990, т. 59, вып. 3, с. 491—498.
- Никитин Д. И., Васильева Л. В., Лохмачева Р. А. Новые и редкие формы почвенных микроорганизмов. М., Наука, 1966, 70 с.
- Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Под ред. Красильникова Н. А. М., Изд-во МГУ, 1966, 216 с.
- Хлебникова Г. М., Гиличинский Д. А., Федоров-Давыдов Д. Г., Воробьева Е. А. Количественная оценка микроорганизмов в многолетнемерзлых отложениях и погребённых почвах // *Микробиол.* 1990, т. 59, вып. 1, с. 148—155.
- Barnett J. A., Payne R.W. & Yarrow D. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press. Cambridge Sydney, 1983, 811 p.
- Gilichinsky D., Wagener C. *Microbial life in permafrost // Viable microorganisms in permafrost* / Ed. Gilichinsky D. Pushchino, 1994, p. 7—20.
- Kreger van Rij N. J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 1984, 1082 p.

Поступила в редакцию
10 июня 1997 г.