

СИНЕЗЕЛЕННЫЕ И ЗЕЛЕННЫЕ ВОДОРОСЛИ ИЗ ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ОСАДОЧНЫХ ПОРОД АРКТИКИ

Т. А. Вишневская, Л. Г. Ерохина, Д. А. Гиличинский, Е. А. Воробьева*

Институт почвоведения и фотосинтеза РАН, 142292, Московская обл., г. Пушкино, Россия

* *Московский государственный университет, ф-т почвоведения, 119899, Москва, Воробьевы горы, Россия*

В мерзлых осадочных отложениях Колымской низменности различного возраста и генезиса определено содержание общего хлорофилла. В молодых голоценовых осадках содержание фотосинтетических пигментов достигает 25×10^{-2} мг/г, а в более древних (плиоценовых) осадках содержание фотосинтетических пигментов менее чем $2,8 \times 10^{-2}$ мг/г.

Впервые из мерзлых осадков выделены жизнеспособные микроводоросли, которые являются высшими из выделенных на сегодняшний день микроорганизмов, длительное время существующих в переохлажденном состоянии при недоступности субстрата и отсутствии условий для фотохимических реакций. В 34% изученных образцов мерзлых осадочных пород отмечался рост микроводорослей. Среди выделенных 28 штаммов водорослей 36% являлись синезелеными водорослями (цианобактериями) и относились к порядкам *Nostocales* (роды *Nostoc*, *Anabaena*) и *Oscillatoriales* (роды *Oscillatoria* и *Phormidium*). Зелеными водорослями в основном порядка *Chlorococcales* (роды *Chlorococcum* и *Chlorella*) были представлены 64% изолятов.

Арктика, вечная мерзлота, хлорофилл, цианобактерии, водоросли

BLUE-GREEN AND GREEN ALGAE FROM ARCTIC PERMAFROST

T.A. Vishnivetskaya, L.G. Erokhina, D.A. Gilichinsky, E.A. Vorobyova*.

Institute of Soil Science and Photosynthesis of the RAS, 142292, Pushchino, Moscow Region, Russia

* *Moscow State University, Department of Soil Science, 119899, Moscow, Vorobjovy Gory, Russia*

The contents of total chlorophyll in ancient cryogenic sediments of the Kolyma lowland have been calculated. The contents of photosynthetic pigments attains 25×10^{-2} mg/g in young Holocene sediments and the contents of photosynthetic pigments is less than $2,8 \times 10^{-2}$ mg/g in more ancient (Pliocene) sediments.

Viable microalgae have been isolated for the first time from Permafrost. These are the highest, of all known to date, biological systems surviving long periods in the overcooled state under inaccessibility of frozen substrate and conditions precluding photochemical reactions. The microalgae growth was observed in 34% of studied Permafrost samples. 36% of 28 isolated algal strains were blue-green algae (cyanobacteria) of order *Nostocales* (generas *Nostoc*, *Anabaena*) and order *Oscillatoriales* (generas *Oscillatoria* and *Phormidium*). 64% microalgae were green algae of order *Chlorococcales* (generas *Chlorococcum* and *Chlorella*).

Arctic, Permafrost, chlorophyll, cyanobacteria, algae

ВВЕДЕНИЕ

Исследования вечномерзлых пород показали, что криосфера Земли содержит значительное количество жизнеспособных микроорганизмов, представленных преимущественно прокариотами [Звягинцев и др., 1985; Gilichinsky et al., 1992]. Однако все еще мало известно о видовом разнообразии фотосинтезирующих организмов, обитающих в столь экстремальных условиях. Фотосинтезирующие пурпурные несерные бактерии, относящиеся к роду *Rhodospseudomonas*, были выделены из едомных отложений Колымской низменности [Бурашникова и др., 1994]. Факты выделения водорослей из мерзлых толщ не известны. Лишь однажды при микроскопических исследованиях мерзлых отложений Сухих Долин

Антарктиды были обнаружены [Cameron et al., 1974] пустые филаменты синезеленых водорослей, которые имели сходство с *Calothrix sp.*, а также присутствие кокоидных зеленых водорослей подобных *Chlovococcum sp.* и цист простейших (*Protozoa*).

Холодостойкость водорослей подтверждается широким распространением их в поверхностных местообитаниях с постоянной или длительной низкой температурой (водоросли снега и льда). Показано, что криптоэндолитические водоросли — важнейшая составная часть растительности Антарктиды [Friedmann et al., 1984].

Наибольший общебиологический интерес представляют почвенные микроводоросли как

организмы необыкновенной выносливости и устойчивости к экстремальным условиям существования. Они самые неприхотливые живые организмы, способные заселять породы и осуществлять метаболизм не только при наличии лишь капельножидкой воды и света, но и сохранять жизнеспособность в полной темноте, а в ряде случаев даже размножаться [Голлербах, 1977].

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Цель нашей работы выяснить могут ли микроводоросли, относящиеся к низшим растениям, сохраняться в мерзлых осадках и изучить их видовой состав и морфологические особенности в связи с необычными условиями их существования. Предпосылкой к данной работе послужило обнаружение фотосинтетических пигментов в вечномерзлых отложениях [Gilichinsky *et al.*, 1992].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали мерзлые образцы, отобранные из керна скважин Колымской низменности с соблюдением строгих условий асептики в экспедициях 1989—1996 гг. Со времени взятия образцов и до их посева на питательные среды они хранились при температурах -12°C , что соответствовало режиму их криоконсервации в природных условиях.

Проанализировано 150 образцов (из 7 скважин) мерзлых осадочных пород разного возраста и генезиса. Фотосинтетические пигменты экстрагировали 80% ацетоном (соотношение порода : ацетон составляло 1:4). Концентрацию общего хлорофилла в экстрактах рассчитывали по формуле $C = 0,58 \times D_{652} = [\text{мг/мл}]$, используя величину поглощения при длине волны 652 нм (D_{652}) и коэффициент экстинкции [Arnon, 1949; Hipkins *et al.*, 1986]. Зная объем экстракта и массу навески, рассчитывали содержание суммарного хлорофилла на 1 г абсолютно сухой почвы.

Для выделения жизнеспособных водорослей отбирали образцы с наиболее высоким содер-

жанием фотосинтетических пигментов (табл. 1). В ходе работы было исследовано 67 образцов мерзлых осадочных пород разного возраста и генезиса. Для получения накопительной культуры водорослей, исследуемые мерзлые образцы (1—2 г) ненарушенного строения помещали в стерильные чашки Петри и при увлажнении средой (до 80—100% полной влагоемкости) культивировали при постоянном слабом (около 500 люкс) освещении белым светом люминесцентных ламп и температуре 22°C в течение одного—двух месяцев. О росте водорослей судили по появлению зеленых пленок на поверхности среды и на стенках чашек. Для предохранения посевов от заражения из воздуха и уменьшения потери влагоемкости при длительном выдерживании в комнате чашки оборачивали парафином (Parafilm, „Sigma“) и помещали в промытые спиртом стеклянные сосуды с крышками. Для обнаружения и выделения микроводорослей была использована простая по составу минеральная среда Бристоль в модификации Голлербаха: (г/л) NaNO_3 — 0,25; KH_2PO_4 — 0,25; MgSO_4 — 0,15; CaCl_2 — 0,05; NaCl — 0,05; Fe_2Cl_6 — следы [Голлербах и др., 1969]. Выделение альгологически чистых культур проводили путем многократных посевов накопительной культуры на агаризованную среду Бристоль (1,5% агара). Выделенные водоросли подерживали на агаризованной (1,5%) среде Болда [Brown *et al.*, 1964]. Температурные границы роста выделенных водорослей определяли при культивировании изолятов на агаризованной (1,5% агара) среде Болда при разной температуре ($+4^{\circ}\text{C}$, $+22^{\circ}\text{C}$ и $+27^{\circ}\text{C}$) и постоянном освещении.

Для выделения прокариотических микроорганизмов использовали крахмал-аммиачную среду следующего состава (г/л): крахмал -10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, K_2HPO_4 — 1, MgSO_4 — 1, NaCl — 1, CaCO_3 — 3, агар — 20.

Выделенные микроводоросли, выращенные на агаровых пластинках, первоначально характеризовали используя спектральные методы измерения спектров возбуждения флюоресцен-

Таблица 1. Встречаемость водорослей в вечномерзлых осадочных породах разного возраста

Скважина	Глубина, м	Возраст	Кол-во исследованных образцов	Кол-во образцов с хлорофиллом	Содержание суммарного хлорофилла в образцах, 10^{-2} мг/г	Кол-во образцов с жизнеспособными бактериями	Кол-во образцов с жизнеспособными водорослями
1/95	0,9—15,5	0—3 тыс. лет	25	25	$12,9 \pm 4,6$	22	11
2/95	0,3—9,0	5—7 тыс. лет	17	17	$8,3 \pm 2,8$	17	9
3/96	0,3—4,0	5—7 тыс. лет	5	5	$11,7 \pm 2,4$	5	1
3/96	4,4—8,0	25—40 тыс. лет	7	7	$5,7 \pm 0,5$	7	2
2/89	31,5 до 49,4	0,6—1,8 млн лет	5	5	$5,4 \pm 1,0$	5	0
11/89	56,8 до 57,5	>1,8 млн лет	2	2	$3,6 \pm 0,1$	2	0
2/89	51,6 до 63,2	~3 млн лет	4	4	$5,0 \pm 2,0$	4	2

пии максимума хлорофилла „а“ при длине волны 686 нм на спектрофлуорометре Hitachi 850 (Япония).

Для микроскопических исследований водоросли фиксировали раствором Люголя (1 г иодида калия и 1 г кристаллического иода в 100 мл воды) и просматривали по методу фазового контраста в световом микроскопе.

Для идентификации водорослей использовали определители [Голлербах и др., 1953; Голлербах, 1977; Комаренко и др., 1978].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наибольшая аккумуляция фотосинтетических пигментов обнаружена в голоценовых осадках (рис. 1): в некоторых образцах содержание общего хлорофилла достигало 25×10^{-2} мг/г, а в двух пробах озерных осадков содержание общего хлорофилла было максимальным и составляло $36,4 \times 10^{-2}$ и 46×10^{-2} мг/г (на диаграмме эти значения не показаны, так как они резко отличаются от других данных). Для голоценовых осадков характерен значительный разброс значений содержания общего хлорофилла от горизонта к горизонту. При переходе от голоцена к плейстоцену наблюдается резкое падение содержания общего хлорофилла, и при дальнейшем увеличении возраста до позднего плиоцена оно остается на том же низком ($2,8 \times 10^{-2}$ мг/г) уровне.

Жизнеспособные синезеленые и зеленые микроводоросли были выявлены в 23 образцах, что составляет 34% от общего количества исследованных образцов мерзлых осадочных пород (см. табл. 1). Выделение альгологически чистых культур проводили путем многократных посевов

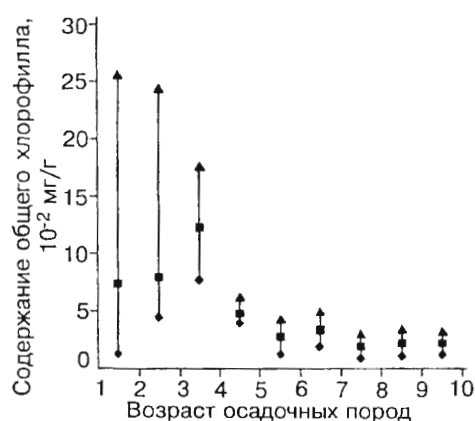


Рис. 1. Накопление и распределение фотосинтетических пигментов в мерзлых осадочных породах разного возраста:

1 — 0—3 тыс. лет, 2, 3 — 5—7 тыс. лет, 4 — 25—40 тыс. лет; 5 — 200—300 тыс. лет, 6 — 0,6—1,8 млн лет, 7 — >1,8 млн лет; 8, 9 — ~3 млн лет.

накопительной культуры на агаризованную среду Бристоль (1,5% агара), что дает возможность по характеру роста на поверхности разделить между собой выделяемые виды водорослей. При посеве из образцов, содержание фотосинтетических пигментов в которых было максимальным (более 20×10^{-2} мг/г сухой почвы), наблюдался гетеротрофный рост зеленых водорослей, относящихся к порядку *Chlorococcales*, на крахмал-аммиачном агаре в темноте (разведение 1:10, 20°C, 2—3 темно-зеленые колонии на чашке). Среди выделенных 28 штаммов водорослей 36% являлись синезелеными, а 64% изолятов — зелеными водорослями.

Детальная характеристика изолятов приводится на примере водорослей, выделенных из мерзлых голоценовых озерных осадков (скв. 1/95) до глубины 15,5 м. Из данной скважины выделенно 16 культур водорослей, 7 из которых оказались синезелеными водорослями и относились к порядкам *Nostocales* (роды *Nostoc*, *Anabaena*) и *Oscillatoriales* (роды *Oscillatoria* и *Phormidium*). А среди зеленых наиболее характерны водоросли порядка *Chlorococcales* (роды *Chlorococcum* и *Chlorella*) (табл. 2). Наиболее характерные синезеленые и зеленые водоросли описаны ниже.

Таблица 2. Распределение водорослей в мерзлых озерных осадках голоценового возраста (скв. 1/95)

Глубина, м	Количество бактерий, кл/г	Содержание хлорофилла, 10^{-2} мг/г	Номера выделенных штаммов	Порядок, род
1,6—1,65	5×10^3	$9,9 \pm 0,1$	195-A14	<i>Chlorophyta</i> , <i>Chlorella</i>
2,4—2,45	$8,5 \times 10^3$	$7,0 \pm 0,2$	195-A12	<i>Cyanophyta</i> , <i>Phormidium</i>
			195-A2	<i>Cyanophyta</i>
			195-A4	<i>Chlorophyta</i> , <i>Chlorococcum</i>
3,42—3,5	$2,9 \times 10^4$	$5,6 \pm 0,1$	195-A17	<i>Chlorophyta</i>
8,9—8,95	ед.	$5,5 \pm 0,1$	195-A15	<i>Chlorophyta</i>
9,4—9,35	5×10^2	$5,6 \pm 0,2$	195-A24	<i>Chlorophyta</i>
10,1—10,15	$1,1 \times 10^3$	$36,0 \pm 0,4$	195-A8	<i>Chlorophyta</i> , <i>Chlorella</i>
10,15—10,2	4×10^2	$46,0 \pm 1,0$	195-A10	<i>Chlorophyta</i>
10,3—10,35	2×10^2	$24,7 \pm 0,4$	195-A5	<i>Chlorophyta</i>
			195-A25	<i>Chlorophyta</i>
			195-A7	<i>Cyanophyta</i> , <i>Oscillatoria</i>
13,7—14,2	$1,2 \times 10^3$	$5,6 \pm 0,2$	195-A23	<i>Cyanophyta</i> , <i>Phormidium</i>
			195-A20	<i>Cyanophyta</i> , <i>Oscillatoria</i>
14,8—14,9	$1,4 \times 10^2$	$5,2 \pm 0,2$	195-A22	<i>Cyanophyta</i> , <i>Nostoc</i>
			195-A21	<i>Cyanophyta</i> , <i>Anabaena</i>

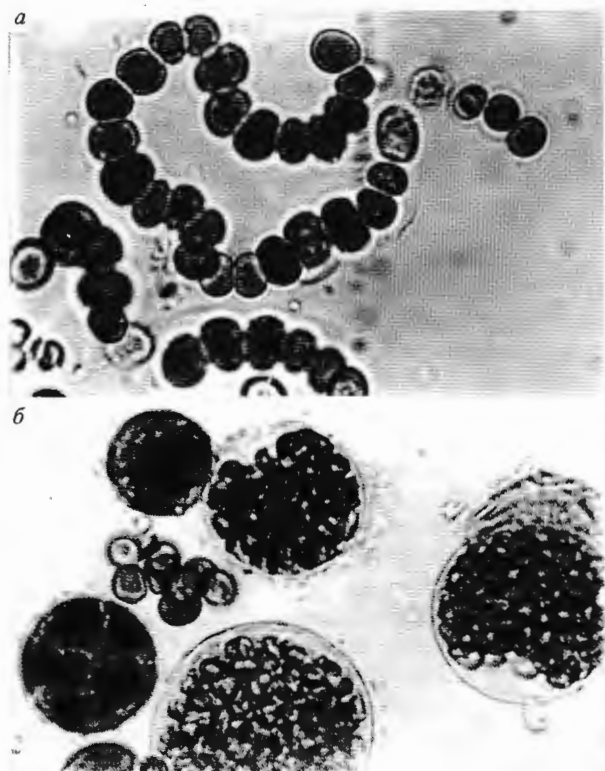


Рис. 2. Синезеленые нитчатые водоросли класса *Hormogoniophyceae*, семейство *Nostocales* (род *Nostoc*), выделенные из вечномерзлых осадочных пород с глубины 14,8 м (скв. 1/95) — а.

Увел. 960×.

Зеленые одноклеточные водоросли порядка *Chlorococcales*, семейство *Chlorococcaceae* (род *Chlorococcum*), выделенные из вечномерзлых осадочных пород с глубины 2,4 м (скв. 1/95) — б.

Увел. 640×.

Морфология

Отдел *Cyanophyta*

Класс *Hormogoniophyceae*

Семейство *Nostocaceae*

Многоклеточные нитчатые водоросли, клетки которых соединены друг с другом, образуя трихомы. Трихомы голые, без слизистых влагалищ, в трихомах имеются гетероцисты (рис. 2, а).

Отдел *Chlorophyta*

Класс *Chlorophyceae*

Порядок *Chlorococcales*

Клетки свободноплавающие, одиночные или во временных скоплениях, без колониальной слизи, шаровидные. Хлоропласт пристенный, с

одним пиреноидом. Бесполое размножение автоспорами, зооспорами (рис. 2, б).

Физиологическая характеристика

Были определены температурные границы роста выделенных водорослей культивированием изолятов при разных температурах (+4°C, +20°C и +27°C) и постоянном освещении. Все выделенные культуры зеленых водорослей и один штамм синезеленых водорослей *Oscillatoria sp.* (195-A20) хорошо росли в широком температурном диапазоне от +4°C до +27°C и относятся к психротрофным микроорганизмам. Синезеленые водоросли *Nostoc sp.* (195-A22) и *Anabaena sp.* (195-A21) не росли при температуре +4°C, но росли при температуре +27°C. Наиболее узкими границами роста характеризовались синезеленые водоросли *Oscillatoria sp.* (195-A7) и *Phormidium sp.* (195-A12): оптимальный рост наблюдался при комнатной температуре, при +4°C и +27°C рост отсутствовал. Синезеленые водоросли из мерзлых осадочных отложений являются мезофильными организмами и имеют более узкие температурные границы роста, по сравнению с зелеными водорослями, выделенными из тех же отложений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для характеристики выделенных микроводорослей использовали спектральные методы исследования, что позволило ускорить идентификацию. Как известно, энергия квантов света, поглощенная дополнительными пигментами — хлорофиллом „b“ в зеленых водорослях и фикобилиновыми пигментами в цианобактериях, мигрирует на молекулы хлорофилла „a“ реакционных центров фотосинтеза. Поэтому в спектрах возбуждения флюоресценции хлорофилла „a“ присутствуют полосы поглощения хлорофилла „b“ в случае зеленых водорослей или фикобилипротеидов в случае цианобактерий (рис. 3). В представленных спектрах возбуждения флюоресценции хлорофилла „a“ суспензий различных культур микроводорослей видны полосы поглощения либо хлорофилла „b“ в области 450—500 нм, либо фикобилипротеидов в области 550—650 нм, что свидетельствует о преимущественном содержании в первом случае зеленых водорослей, во втором — цианобактерий. Это позволило определить зеленые и синезеленые водоросли, четко различающиеся по составу фотосинтетических пигментов.

Проведенные исследования показали, что цианобактерии и эукариотические зеленые микроводоросли сохраняются в течение геологически длительного времени, при этом наиболее часто они встречаются в голоценовых осадках

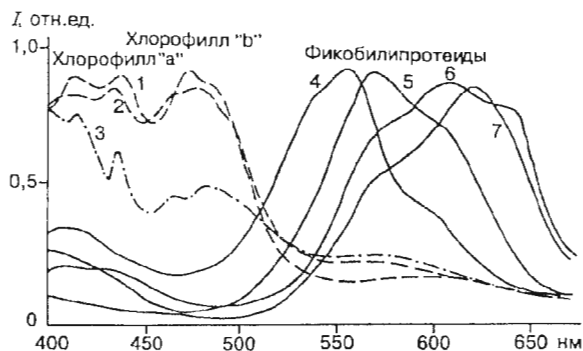


Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции хлорофилла „а“ при длине волны 686 нм суспензии клеток цианобактерий и зеленых водорослей:

1, 2 — зеленые водоросли, 3 — смесь зеленых и синезеленых водорослей, 4, 5, 6, 7 — синезеленые водоросли.

(см. табл. 1). Это высшие из известных жизнеспособных биологических систем, длительное время (до 3 млн лет) существующих в переохлажденном состоянии при недоступности субстрата и полном отсутствии света — необходимого источника энергии для фотохимических реакций. Известно, что многие водоросли способны существовать в условиях крайне низкой, не свойственной им, освещенности, а иногда и в полной темноте [Голлербах, 1977]. При этом у них могут происходить определенные изменения в пигментном составе или/и в способе питания. Так представители многих отделов водорослей (например, *Euglenophyta*, *Chrysophyta* и др.) способны при отсутствии света и избытке органических веществ переходить к гетеротрофному способу питания. Известно, что нижний температурный предел функционирования процесса фотосинтеза в криптоэндолитических водорослях находится в пределах от -6°C до -9°C [Friedmann et al., 1984]. Наши исследования показали, что в условиях вечной мерзлоты не происходит нарушений в структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата и при длительном воздействии отрицательных (до -12°C) температур. Вода в растительной клетке существует в двух формах: связанная вода и резервная вода, участвующая в стабилизации внутриклеточного осмотического давления. Осмотическое давление в клетке водорослей способно быстро меняться. Этот механизм обеспечивает устойчивость водорослей к высыханию, к резким колебаниям солености и к низким температурам. Например, криофильные водоросли сохраняют жизнеспособность после вмерзания в лед, подвергаясь сильному охлаждению в зимнее время, когда температура опускается на несколько десятков градусов

ниже нуля. Криофильные водоросли начинают вегетировать сразу же, как только вокруг них появляется вода [Голлербах, 1977]. Вероятно, этот механизм играет важную роль и в сохранении их жизнеспособности при длительном пребывании в мерзлых толщах, где роль внешнего криопротектора выполняют пленки незамерзшей воды, обволакивающие органично-минеральные частицы [Gilichinsky et al., 1993]. Известно, что при понижении температуры клетки микроорганизмов сжимаются из-за уменьшения количества резервной внутриклеточной воды. При этом в клетках увеличивается концентрация растворенных веществ и, как следствие, понижается точка заморзания внутриклеточного раствора и повышается осмотическое давление. Такая клетка может длительное время существовать при отрицательных температурах, характерных для мерзлых толщ, окруженная пленками незамерзшей воды и внеклеточными кристаллами льда, без сжатия и формирования внутриклеточного льда [McGrath et al., 1994].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа является первым сообщением относительно выделения жизнеспособных при отрицательных температурах низших палеорастений. Проведенные исследования показали, что фотоавтотрофные организмы — синезеленые и зеленые водоросли, относящиеся к низшим растениям и являющимися высшими микроорганизмами, выделенными из криолитиозоны, сохраняют жизнеспособность на протяжении значительного периода времени при постоянном воздействии отрицательных температур и полном отсутствии света. При этом не происходит нарушений в структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата, что позволяет им при благоприятных условиях переходить к активному росту.

Литература

Бурашникова Е.Н., Гоготов И.Н. Свойства пурпурной несерной бактерии, выделенной из многолетней мерзлой породы Колымской низменности // Микробиол., 1994, т. 63, № 5, с. 868—875.

Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2, М., изд-во Советская Наука, 1953, 651 с.

Голлербах М. М., Штина Э. А. Почвенные водоросли., Л., Наука, 1969, 228 с.

Голлербах М.М. Жизнь растений (водоросли и лишайники). М., Просвещение, 1977, т. 3, 487 с.

Звягинцев Д.Г., Гиличинский Д.А., Благодатский С.А. и др. Длительное сохранение микроорганизмов в постоянно мерзлых осадочных породах и погребенных почвах // Микробиол., 1985, т. 54, № 1, с.155—161.

Комаренко Л.Е., Васильева И.И. Пресноводные зеленые водоросли водоемов Якутии. М., Наука, 1978, 283 с.

- Arnon D.J. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.*, 1949 vol. 24, p. 1—15.
- Brown R.M., and Bold H.C. Comparative studies of the algal genera *Tetracystis* and *Chlorococum* // *Phycological studies*. Univ. Texas Publ., 1964, vol. 6417, p. 1—213.
- Cameron R.E., Morelli F.A. Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor Valley drill core // *Antarctic J. US*, 1974, vol. IX, № 4, p. 113—116.
- Gilichinsky D.A., Vorobyova E.A., Erokhina L.G. et al. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost // *Advance Spase Research*. 1992, vol. 12, № 4, p. (4)255—(4)263.
- Gilichinsky D.A., Soina V.S., Petrova M.A. Cryoprotective properties of water in the Earth cryolithosphere and its role in exobiology // *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 1993, vol. 23, p. 65—75.
- Friedmann E.I., Ocampo-Friedmann R. Endolithic microorganisms in extreme dry environments: analysis of a lithobiontic microbial habitat // *Current perspectives in microbial ecology* / Ed. Klug M.J. and Reddy C.A. 1984, vol. XII, p. 177—185.
- Hipkins M.F., Baker N.R. Spectroscopy // *Photosynthesis energy transduction a practical approach* / Ed. Hipkins M.F. and Baker N.R. IRL Press, Oxford, Washington, 1986, p. 51—100.
- McGrath J., Wagener S., Gilichinsky D. Cryobiological studies of ancient microorganisms isolated from the Siberian permafrost // *Viable microorganisms in permafrost* / Ed. Gilichinsky D. Pushchino, 1994, p. 48—67.

*Поступила в редакцию
2 июня 1997 г.*