

МИКРОБИОЛОГИЯ КРИОСФЕРЫ

УДК 631.46:579.8.017

ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ АКТИНОБАКТЕРИИ ИЗ ДРЕВНИХ
ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СИБИРИ

С. Г. Карасев, Л. В. Гурина, Е. Ю. Гавриш, В. М. Аданин,
Д. А. Гиличинский,* Л. И. Евтушенко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

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

Проведено таксономическое изучение мезофильных актиномицетов и близких грам-положительных бактерий с высоким содержанием G+C пар в ДНК, доминирующих в высевах из мерзлых позднелиценевых образцов томус-ярской и олерской свит Колымской низменности. В соответствии с культуральными, морфологическими и хемотаксономическими признаками, изученные к настоящему времени аэробные бактерии отнесены к родам *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Aureobacterium*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Streptomyces*. Анаэробные бактерии идентифицированы как *Propionibacterium* sp. Ряд выделенных бактерий отличается от представителей известных таксонов по химическому составу клеточных стенок и относится к новым видам или родам. Результаты свидетельствуют о таксономическом многообразии жизнеспособных актинобактерий в исследованных субстратах.

Вечномерзлые отложения, Колымская низменность, актинобактерии, актиномицеты, таксономия, клеточная стенка

VIABLE ACTINOBACTERIA FROM ANCIENT SIBERIAN PERMAFROST

S.G. Karasev, L.V. Gurina, E.Yu. Gavrish, V.M. Adanin, D.A. Gilichinsky*, L.I. Evtushenko

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences

* *Institute of Soil Science and Photosynthesis, Russian Academy of Sciences, 142292, Moscow Region, Pushchino, Russia*

A taxonomic study was performed mesophylic actinomycetes and related gram-positive bacteria with high G+C in their DNA which were found to predominate in frozen Late Pliocene samples of Tomus-Yar and Olerian formations (Kolyma lowland). According to the data on cultural, morphological, and chemotaxonomical characteristics, the studied aerobic bacteria were referred to the genera *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Aureobacterium*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Streptomyces*. The anaerobic bacteria were identified as *Propionibacterium* sp. A number of bacteria isolated differ from taxa described in their cell wall composition and belong to the new species or genera. The results obtained are indicative of taxonomic diversity of viable actinobacteria in frozen sediments.

Permafrost, Kolyma lowland, actinobacteria, actinomycetes, taxonomy, cell wall

ВВЕДЕНИЕ

Понимание и прогнозирование процессов, происходящих в биоценозах под воздействием экстремальных условий, зависят от изученности свойств, функций и адаптационного потенциала населяющих их микроорганизмов. Жизнеспособные культивируемые бактерии в вечномерзлых осадках представляют интерес в связи с некоторыми аспектами эволюции микроорганизмов и криобиологии, а также решением практических

задач экологии, имеющих, в частности, отношение к проблеме сохранения биологического разнообразия на Земле.

Факт длительного (до первых миллионов лет) сохранения микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в вечномерзлых отложениях считается установленным [Звягинцев и др. 1985; Gilichinsky, Wager, 1995] и заверенным характеристикой микробных сообществ — общей

численности, групповом составе, ферментативной активности и т. д. [Хлебникова и др., 1990; Звягинцев и др., 1990; Friedmann, 1994; Vorobyova, Soina, 1994; Ривкина и др., 1997].

Важным аспектом исследований сообществ микроорганизмов является детекция *in situ* и *ex situ* индивидуальных представителей сообщества с использованием микробиологических, биохимических и молекулярно-биологических методов, углубленное всестороннее изучение свойств и возможностей микроорганизмов и их точная идентификация. Знание таксономической принадлежности членов сообщества позволяет прогнозировать многие их свойства с учетом данных многолетних исследований известных микроорганизмов одноименных и близких таксонов.

Об обнаружении в вечномёрзлых субстратах различного генезиса и возраста до 40 тыс. лет организмов порядка *Actinomycetales* (грам-положительных бактерий с высоким содержанием Г+Ц пар в ДНК), не содержащих эндоспор, обуславливающих особую устойчивость бактерий к экстремальным условиям, сообщалось ранее [Звягинцев и др., 1990; Kalinina et al., 1994]. Отмечалось доминирование кокков, коринеформных бактерий и мицелиальных актиномицетов, среди которых были идентифицированы организмы родов *Micrococcus*, *Deinococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* и *Streptomyces*.

В данной работе представлены результаты таксономического изучения группы жизнеспособных актинобактерий, выделенных при температурах +20 и +37 °С из образцов более древних мерзлых отложений (1,8—3,0 млн лет), с высоким содержанием общего углерода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы мерзлые супеси и суглинки томус-ярской и олерской свит, отобранные на Колымской низменности в бассейнах рек Бол. Чукочьа и Бол. Хомус-Юрях с глубин 50—60 м. Согласно палеомагнитным и палинологическим данным, формирование этих свит и их сингенетическое промерзание относится ко второй половине плиоцена (1,8—3 млн лет). Общее содержание углерода в образцах: 0,98—3,19 % (таблица). Методы отбора и хранения проб, контроля стерильности и общая характеристика района исследований описаны ранее [Гиличинский и др., 1989; Хлебникова и др., 1990; Shi et al., 1997].

Численность микроорганизмов определяли методом высева на плотные питательные среды: мясо-пептонный (МПА) и коринебактериальный (КБА) агары (десятикратно разбавленные), пептонно-кукурузный, минеральный с пропионатом (М-3) и сусло-агары [Каталог..., 1992; Rowbotham, Cross, 1977]. Степень разведения

образца подбирали экспериментально. Подсчет колоний проводили через 14 сут. культивирования при +20 °С. Для выделения и получения чистых культур анаэробных бактерий использовали полужидкие (0,2 % агара) и твердые белковые среды [Bergey's manual..., 1986], которые инокулировали 0,2 мл почвенного образца из разведений 1:1000 и 1:10000. Посевы выращивали в микроанаэротатах, в атмосфере 80 % азота, 10 % углекислого газа и 10 % водорода при +37 °С в течение 7—10 суток.

Морфологию и жизненный цикл изучали микроскопированием культур возраста 12—72 ч или 14 сут, выращенных на подходящих средах, с использованием метода фазового контраста. Биомассу для изучения хемотаксономических характеристик аэробных и анаэробных бактерий наращивали в соответствующих условиях на пептонно-дрожжевой среде или МПА с 0,5 % глюкозы.

Диагностические аминокислоты и сахара клеточных стенок определяли по [Bousfield et al., 1985]. Аминокислотный состав пептидогликана изучали в гидролизатах препаратов клеточной стенки (102—104 °С, 6N HCl) на аминокислотном анализаторе LC 600 фирмы Biotronic. Препараты пептидогликана получали по методу Шляйфера и Кандлера [Schleifer, Kandler, 1972]. Состав жирных кислот клеток определяли методом газо-жидкостной хроматографии. Метилловые эфиры для анализа получали по методу, описанному ранее [Евтушенко, Зеленкова, 1989]. Экстракцию и препаративное выделение менахинонов осуществляли по Коллинзу [Collins, 1985]. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе МХ-1310 при энергии ионизации 70 эВ и температуре испарения образца 170—240 °С [Collins et al., 1977]. Получение метиловых эфиров миколовых кислот и их ТСХ-анализ проводили по методу Минникина и др. [Minnikin et al., 1975].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди проанализированных образцов возраста от 1,8 до 3 млн лет максимальная численность и разнообразие аэробных жизнеспособных бактерий обнаружены в образцах, содержащих растительные остатки. Численность бактериальных колоний, выросших в аэробных условиях через 14 сут. при +20 °С, на большинстве сред составляла 6×10^4 — $1,4 \times 10^5$ на 1 г воздушно-сухого образца. Общее содержание углерода в таких образцах: 0,98—3,19 %, что более чем на порядок выше, чем в других, с низкой численностью микроорганизмов.

Численность колоний на десятикратно разбавленной среде КБА представлена в таблице. Среди выросших микроорганизмов доминиро-

Численность* аэробных бактерий в вечномерзлых отложениях Колымской низменности

Район (скважина)	Свита	Возраст, млн лет	Глубина, м	Общий С, %	Численность бактерий	
					общая	стрептомицеты
Долина р. Бол. Хомус-Юрях (11/89)	Томусярская	3,0	53,0	0,98	$5,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
«	«	3,0	60,0	1,47	$1,2 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$
Долина р. Бол. Чукочья (6/90)	Олерская	1,8	50,0	—	$6,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
«	«	1,8	58,8	3,19	$1,4 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$

* Число колоний на 1 г воздушно-сухого образца; прочерк — нет данных.

вали неспорулирующие грам-положительные бактерии и мицелиальные актиномицеты (от 55 до 75 % от общего числа колоний). При этом численность грам-положительных бактерий в целом была сопоставима с таковой актиномицетов, формирующих воздушный мицелий. В значительном количестве встречены капсулообразующие или синтезирующие внеклеточный материал бактерии. Среди изолятов обнаружены также грам-отрицательные и спорующие бактерии и дрожжи.

В чистую культуру изолировано 120 штаммов, представляющих выявленные нами культурально-морфологические типы бактерий. На основании культуральных особенностей изолированных штаммов (пигментации и консистенции колоний), их морфологических характеристик (размеров, формы, типа деления и взаимного расположения клеток) и наличия (отсутствия) диагностических диаминокислот в клеточных стенках (лизина, орнитина и изомеров диаминопимелиновой кислоты — ДАПК), исследованные организмы разделены на 7 групп.

1. Корине- и нокардиоформные бактерии, содержащие мезо-ДАПК. Колонии этой группы бактерий — от кремовой до розово-оранжевой окраски; клетки — неправильные палочки, рудиментарный или хорошо развитый мицелий, распадающийся на палочковидные или кокковидные фрагменты. В состав клеточных стенок этой группы бактерий входит липидно-арабиногалактановый комплекс, обуславливающий особую устойчивость организмов к неблагоприятным условиям. Известны несколько родов актиномицетов и близких бактерий с подобными свойствами — *Rhodococcus*, *Gordona*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Skermania*, *Tsakamuriella*, *Mycobacterium* и *Corynebacterium* [Chun et al., 1997]. Изученные организмы рода *Rhodococcus* по окраске и консистенции колоний и типу миколовых кислот наиболее близки к видам *R. fascians* [Goodfellow, 1984], *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. rhodii* и *R. opacus* [Bergey's manual..., 1989]. Выявленные бактерии рода *Nocardia* наиболее сходны по культуральным признакам с представителями вида *N. otidiscaviarum* [Bergey's manual..., 1989],

а представители рода *Gordona*, идентифицированы как *G. amarae* [Klatte et al., 1994]. Несколько медленно растущих бактерий (видимые колонии формировались в течение 7—14 сут), с диаметром клеток 0,5—0,7 мкм, выраженным циклом развития „кокк-палочка“ и микобактериальным типом миколовых кислот отнесены к 2 видам рода *Mycobacterium* [Minnikin et al., 1975; Bergey's manual..., 1986].

2. Коринеформные бактерии, содержащие орнитин в клеточной стенке. Бактерии этой группы (тонкие, 0,5 мкм в диаметре полиморфные палочки) образовывали колонии желтой окраски и обладали таксономическими признаками, свойственными двум видам рода *Aureobacterium* [Yokota et al., 1993].

3. Коринеформные бактерии, содержащие лизин в клеточной стенке. Представители группы идентифицированы как *Arthrobacter* sp. Они имели белую или слабо кремовую окраску колоний, четко выраженный цикл развития „кок-палочка-кокк“. Подобная морфология и хемотаксономические характеристики свидетельствуют о принадлежности этих бактерий к 2—3 видам группы „*Arthrobacter globiformis*“ [Bergey's manual..., 1986].

4. Кокки. Группа организмов с кокковидными клетками формировали желтые, гладкие, блестящие колонии. В соответствии с дифференцирующей аминокислотой клеточной стенки (лизин) и составом менахинонов дыхательной цепи штаммы идентифицированы как *Kocuria varians* [Stackebrandt et al., 1995]. У представителей обширной группы кокковидных бактерий, в целом близких к организмам рода *Micrococcus*, сочетание морфолого-культуральных и хемотаксономических признаков не соответствовало диагнозу какого-либо из известных таксонов аэробных кокковидных бактерий [Stackebrandt et al., 1995]. Предположительно, подобные организмы могут относиться к *Micrococcus luteus* или близкому новому виду [Schleifer, Kandler, 1972].

5. Нокардиоформные бактерии с LL-ДАПК в клеточной стенке. Эта немногочисленная группа с белыми или кремовыми пастообразными колониями и наличием распадающегося на фраг-

менты мицелия отнесена к роду *Nocardioides*. Изученные штаммы наиболее сходны с представителями вида *N. albus* [Bergey's manual..., 1989].

6. Актиномицеты, образующие воздушный мицелий. Численность бактерий этой группы была сопоставима с таковой коринеформных бактерий и кокков. Они выделялись среди других бактерий наличием воздушного мицелия или плотными, кожистыми колониями на ряде сред. Особенности изученных организмов группы позволяют отнести их к 6—8 видам рода *Streptomyces* [Гаузе и др., 1983].

7. Пропионовокислые бактерии. В анаэробных условиях выделено несколько морфологических типов бактерий. К настоящему времени детально изучена только группа организмов с палочковидными полиморфными клетками, сбрасывающих глюкозу до пропионовой и уксусной кислот. Выявленные признаки характеризуют представителей рода *Propionibacterium* [Bergey's manual..., 1986]. Результаты изучения физиолого-биохимических признаков у выделенных бактерий в сравнении с типовыми штаммами видов этого рода показали, что изоляты образуют гомогенную группу в составе рода *Propionibacterium*, наиболее близкую к виду *P. acnes*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Начальная стадия изучения таксономического состава микроорганизмов из древних вечномерзлых отложений выявила присутствие нескольких групп аэробных и анаэробных мезофильных бактерий актиномицетной линии эволюции, различающихся фенетически и филогенетически. Идентифицированные бактерии отнесены к родам *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Aureobacterium*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Streptomyces*, *Propionibacterium*, объединенные в различные семейства и подпорядки класса *Actinobacteria* [Stackebrandt et al., 1997]. Обнаружен ряд организмов, отличных от представителей известных таксонов по морфолого-культуральным и хемотаксономическим признакам (составу пептидогликанов клеточных стенок и изопреноидных хинонов дыхательной цепи). Очевидно, они принадлежат к новым видам или родам.

Современные представители аэробных родов актинобактерий (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona*, *Arthrobacter*, *Nocardioides*, *Streptomyces*), обнаруженные в мерзлоте, широко распространены в природе и известны способностью утилизировать и трансформировать разнообразные природные и искусственные соединения, синтезировать различные физиологически активные соединения, в их числе, антибиотики.

Примечательна приуроченность ряда изученных организмов родов *Aureobacterium*, *Kocuria*, *Nocardioides* и *Rhodococcus* к отложениям, содержащим дериваты растений. Их современные родственники также ассоциированы с растениями, фитопатогенными нематодами или являются собственно фитопатогенами, как, например, *Rhodococcus fasciens* [Bergey's manual..., 1986; Goodfellow, 1984; Yokota et al., 1993].

Группа анаэробных изолятов оказалась наиболее близкой к виду *P. acnes*, часто выделяемому с поверхности кожи человека, но отличалась от штаммов этого вида по ряду физиологических свойств. Из обширной группы пропионовокислых бактерий в настоящее время наиболее изучены организмы, связанные с молочнокислым производством и сыроделием („классические пропионибактерии“), а также клинические изоляты и бактерии естественной микрофлоры поверхности кожи человека [Bergey's manual..., 1986]. Данные о пропионибактериях окружающей среды крайне фрагментарны [McWeigh et al., 1996]. Обнаруженное в мерзлых породах (а также почвах и подземных водах других регионов) значительное количество пропионибактерий свидетельствует о существовании в природе на протяжении нескольких миллионов лет обширной „природной“ группы этих бактерий. Их дальнейшее изучение на фенетическом и генетическом уровнях расширит представления о разнообразии пропионовокислых бактерий и их роли в естественных микробных сообществах, современных и древних.

На данном этапе исследования невозможно точно ответить на вопросы, действительно ли бактерии актиномицетной линии эволюции преобладают среди всех культивируемых жизнеспособных гетеротрофных микроорганизмов в мерзлоте *in situ* и почему именно группа актинобактерий оказалась наиболее многочисленной среди изолятов, обнаруживаемых микробиологическими методами в исследованных мерзлых осадках, содержащих растительные дериваты.

Бактерии, различные по трофическим потребностям, отношению к кислороду и ферментативным активностям, присутствуют в образцах одновременно. Это говорит о существовании в дисперсных отложениях к моменту их промерзания микроаэрофильных, аэрируемых и бескислородных микроразнообразий с качественно и количественно различными субстратами питания, обеспечивших заселение (и консервацию) в толщах столь широкого спектра микроорганизмов.

Результаты изучения микроорганизмов из вечной мерзлоты, наши и других авторов [Звягинцев и др., 1990], как и накопленные сведения о биологии и экологии актиномицетов и близких бактерий, позволяют считать, что организмы этой группы (или их значительная часть) нахо-

дятся в мерзлых осадках в состоянии покоя. С этим, очевидно, связана их высокая численность относительно других групп микроорганизмов. В пользу этого положения говорят: (а) практически полное отсутствие в исследованных пробах грибов и низкое содержание грам-отрицательных бактерий и дрожжей, входящих в микробные сообщества сходных современных биоценозов [Мишустин, 1984]; (б) относительно высокое содержание не разложенной микроорганизмами в течение миллионов лет органики, в частности, сохранившихся остатков растений; (в) оптимальная температура развития выделенных аэробных организмов +22 — +26 °С.

Относительно высокая численность жизнеспособных актинобактерий возможно обусловлена более благоприятными для них (в сравнении с другими группами бактерий, мицелиальными микромицетами и дрожжами) физико-химическими условиями процесса замораживания заселенного микроорганизмами субстрата (скоростью промерзания, особенностями естественных криопротекторов, степенью адсорбированности микроорганизмов на подходящих поверхностях, локализацией внутри растительных дериватов и т. д.) — при изначально высокой доле актинобактерий в отложениях (дополнительный позитивный фактор). Не исключено, что доминирование актинобактерий в высевах связано с условиями предобработки образца и культивирования. Последние могут быть достаточными для инициации выхода из покоящегося состояния значительной части актинобактерий, формирующих артроспоры, цистоподобные рефрактерные клетки [Мулюкин и др., 1996] или другие, не известные пока типы покоящихся форм, но не иницируют развитие большинства других групп гетеротрофных микроорганизмов.

Эти предположения хорошо согласуются с данными работ авторов и других исследователей по консервации различных микроорганизмов в условиях лаборатории, свидетельствующими о более низкой в целом, в сравнении с рядом других групп организмов (прежде всего, эукариотами), требовательности актинобактерий к условиям консервации и криопротекторам, обеспечивающим их длительную сохранность, а также к условиям выхода клеток из покоящегося состояния [Maintenanse..., 1984].

За феноменом высокой численности актинобактерий в вечномерзлых субстратах безусловно стоит их сложная и зачастую уникальная организация на биохимическом и молекулярно-биологическом уровне. Сюда можно отнести: (а) — наличие метаболических путей и ферментных систем, сравнительно редко встречающихся у других микроорганизмов; (б) — наибольшее, в сравнении с другими бактериями, относительное количество ДНК и множественное дублирование

ее участков, сообщающее организмам определенные преимущества в условиях стресса и давления мутагенных факторов, летальных для других бактерий; (в) — наиболее высокое среди прокариот содержание гуанина и цитозина в ДНК, обуславливающее, видимо, большую устойчивость молекулы к экстремальным воздействиям, и другие [Калакуцкий, Агре, 1977; Palleroni, 1994].

Фактором, ограничивающим развитие микроорганизмов и активность ферментов в мерзлых отложениях, является не только температура, но и связанные с ней физико-химические условия, прежде всего, низкий уровень биологически доступной воды, высокая концентрация растворенных солей и органики и т. д. [Иппис, Ингрэм, 1981; Смит, 1981]. При температуре мерзлых толщ (–10) — (–12) °С, активность воды в почвах и грунтах равна приблизительно 0,85 [Звягинцев и др., 1990]. Некоторые микроорганизмы при таких значениях активности могут медленно развиваться [Лях, 1976]. Основной причиной прекращения роста микроорганизмов при минусовых температурах предполагается высокая чувствительность полисом к пониженным температурам, наблюдавшаяся у многих организмов [Oppenheim et al., 1968; Tai et al., 1973].

Особенности организации генома и фенотипа актиномицетов и близких бактерий определяют некоторую лабильность организмов в экстремальных условиях. Как и данные о росте при –5 и –7 °С некоторых кокковидных и коринеформных психротрофных бактерий, выделенных из почв Антарктиды [Баррос, Морита, 1981], они свидетельствуют о возможности психротрофных (психрофильных) актинобактерий существовать в мерзлоте в активном состоянии в локусах с незамерзшей пленочной и капиллярной водой.

Представители актиномицетов могут развиваться при крайне низких концентрациях источников органического углерода и азота, среди них описаны автотрофные, а также галотолерантные и облигатно галофильные организмы, а также организмы, устойчивые к засушливым условиям [Maintenanse..., 1984; Williams et al., 1972]. Актиномицеты способны существовать в крайне деформированном состоянии, а также в виде сферопластов или L-форм, частично или полностью лишенных клеточной стенки. Этот факт позволяет объяснить, каким образом бактерии, размеры которых исчисляются микронами (или их долями), могут развиваться в капиллярах и пленках незамерзшей воды, толщина которых измеряется ангстремами [Anderson, 1967; Gilichinsky, 1993].

Имеются сведения о наличии у стрептомицетов, именно у видов, обнаруженных нами в образцах вечной мерзлоты, „микроциклов“ (раз-

вития без образования мицелиальной стадии при минимальном использовании источников углерода и азота и затрате энергии) [Калакуцкий, Агре, 1977]. Для большинства представителей этой группы характерно высокое содержание ненасыщенных жирных кислот в мембранах. Именно такие мембраны лучше функционируют при низких температурах [Wilson et al., 1970]. Определенную связь с возможной активностью актиномицетов при низких температурах могут иметь особенности строения клеточных стенок, насыщенных липидами (родококки и близкие группы), а также отрицательный заряд поверхности клеток (стрептомицеты) [Наумова, 1979] или обильное капсулообразование, увеличивающие неспецифическую адсорбцию организмов к поверхностям, и ряд других свойств.

Однако, как и все изученное микробное население мерзлых толщ, выделенные актинобактерии являются все же мезофилами, хотя и с рядом явных психротрофных свойств (диапазон температур роста от +4 до +37 °С, оптимум роста +22 — +26 °С). Мезофильный статус изученных актинобактерий, как и ряд их вышеперечисленных особенностей, служат скорее аргументами в пользу того, что развитие большинства организмов этой группы в условиях постоянных отрицательных температур маловероятно, и выделенные нами бактерии представляют собой сохранившуюся в жизнеспособном состоянии часть микробного сообщества, сформировавшегося в предшествующий промерзанию период времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уже на данном этапе исследований ясно, что в вечной мерзлоте сохраняются в жизнеспособном состоянии самые разнообразные бактерии актиномицетной линии эволюции, обнаруживаемые микробиологическими методами в значительных количествах. Они различаются по химическому составу клеток и клеточных стенок, трофическим потребностям и ферментативным активностям. На примере актинобактерий показана связь между содержанием органического вещества и численностью микроорганизмов, что не удавалось обнаружить при работах с микробным сообществом в целом [Звягинцев, 1985; Gilichinsky, 1997]. Эта группа микроорганизмов оказалась наиболее устойчивой, среди изученных, к фактору времени, т. е. к продолжительности времени криоконсервации. Численность и разнообразие выделенных наиболее древних (позднеплиоценовых) жизнеспособных актинобактерий принципиально не отличается от таковых в относительно молодых (позднеплейстоценовых и голоценовых) осадках [Звягинцев и др., 1990; Kalinina et al., 1994], т. е., редукция бактерий актиномицетной линии развития в

связи с возрастом мерзлоты (и их собственным), по-видимому, незначительна. Это позволяет рассматривать актинобактерии в целом как перспективную группу для решения некоторых вопросов эволюции микроорганизмов на геологическом отрезке времени существования современной криолитосферы.

Для ответа на вопрос, имеются ли среди актинобактерий организмы, метаболически активные в условиях отрицательных температур, как и подтверждения ряда высказанных выше предположений, необходимы дальнейшие всесторонние исследования микробного населения мерзлых отложений, включая их детекцию *in situ*, с использованием прямых молекулярно-биологических и электронно-микроскопических методов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 98-04-49504 и № 98-04-49065а).

Литература

- Баррос Д., Морита Р. Жизнь микроорганизмов при низких температурах // Жизнь микроорганизмов при экстремальных условиях. М., Мир, 1981, с. 19—88.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. // Определитель актиномицетов. М., Наука, 1983, 248 с.
- Гиличинский Д. А., Хлебникова Г. М., Звягинцев Д. Г. и др. Микробиологические характеристики при изучении осадочных пород криолитозоны // Изв. АН СССР, сер. геол., 1989, № 6, с. 114—126.
- Евтушенко Л. И., Зеленкова Н. Ф. О таксономическом положении актиномицетов «*Proactinomyces farineus*» // Микробиология, 1989, т. 58, № 3, с. 498—500.
- Звягинцев Д. Г., Гиличинский Д. А., Благодатский С. А. и др. Длительность сохранения микроорганизмов в постоянно мерзлых осадочных породах и погребенных почвах // Микробиология, 1985, т. 54, № 1, с. 155—161.
- Звягинцев Д. Г., Гиличинский Д. А., Хлебникова Г. М. и др. Сравнительная характеристика микробных сообществ многолетнемерзлых пород различного возраста и генезиса // Микробиология, 1990, т. 59, № 3, с. 491—498.
- Иннис У., Ингрэм Д. Жизнь микроорганизмов при низких температурах: механизмы и молекулярные аспекты // Жизнь микробов в экстремальных условиях. М., Мир, 1981, с. 89—123.
- Калакуцкий Л. В., Агре Н. С. Развитие актиномицетов. М., Наука, 1977, 285 с.
- Каталог культур микроорганизмов ВКМ // Отв. ред. Л. В. Калакуцкий. Пущино-Москва, 1992, 362 с.
- Лях С. П. Адаптация микроорганизмов к низким температурам. М., Наука, 1976, 240 с.
- Мишустин Е. Н. Ценозы почвенных микроорганизмов // Почвенные организмы как компоненты биогеоценоза. М., Наука, 1984, 247 с.
- Мулюкин А. Л., Луста К. А., Грязнова М. Н. и др. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // Микробиология, 1996, т. 65, № 6, с. 782—789.
- Наумова И. Б. Тейхоевые кислоты грамположительных бактерий // Успехи биологической химии, 1979, т. 20, с. 128—151.
- Ривкина Е. М., Фридрих Е. И., МакКей К. М. и др. Метаболическая активность микроорганизмов в вечной мерзлоте // Мат-лы Междунар. конф. „Проблемы криологии Земли“, Пущино, 1997, с. 197—198.

- Смит Д. Значение воды для микроорганизмов в природе // Жизнь микробов в экстремальных условиях. М., Мир, 1981, с. 426—439.
- Хлебникова Г. М., Гиличинский Д. А., Федоров-Давыдов Д. Г. и др. Количественная оценка микроорганизмов в многолетнемерзлых отложениях и погребенных почвах // Микробиология, 1990, т. 59, N 1, с. 148—154.
- Anderson D. M. Ice nucleation and the substrate-ice interface // Nature, 1967, vol. 216, p. 563—566.
- Bergey's manual of systematic bacteriology // Eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe et al., Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1986, vol. 2, p. 965—1599.
- Bergey's manual of systematic bacteriology // Eds: S.T. Williams, M. Sharpe, J.G. Holt, Baltimore, Williams and Wilkins Co., vol. 4, 1989: p. 2299—2648.
- Bousfield I. J., Keddie R. M., Dando T. R. et al. Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of aerobic coryneform bacteria // Chemical Methods in Bacterial Systematics, London, Academic Press, 1985, p. 267—287.
- Chun J., Blackall L. L., Kang S.-O. et al. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. // Inter. J. of Systematic Bacteriology, 1997, vol. 47, No 1, p. 127—131.
- Collins M. D. Isoprenoid quinone analysis in bacterial classification and identification // Chemical Methods in Bacterial Systematics, Academic Press Ltd, 1985, p. 267—287.
- Collins M. D., Pirouz T., Goodfellow M. et al. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria // J. Gen. Microbiol., 1977, vol. 100, No 2, p. 221—230.
- Friedmann I. Permafrost as microbial habitat // Viable microorganisms in permafrost. Puchshino, 1994, p. 21—26.
- Gilichinsky D. A. Viable microorganisms in permafrost: the spectrum of possible applications to new investigations in science for cold regions // Ed. V. Lunardini. Thermal engineering & science for cold regions. IV Intern. Symposium. US Army Research and Engineering Laboratory, Hanover, p. 211—221.
- Gilichinsky D., Wagener S. Microbial life in permafrost (A Historical Review) // Permafrost and Periglacial Processes, 1995, vol. 5, p. 243—250.
- Gilichinsky D. Permafrost as a microbial habitat: extreme for the Earth, favorable in Space // Ed. R. B. Hoover. Instruments, Methods and Missions for the Investigation of Extraterrestrial Microorganisms. Proceedings of SPIE, 1997, vol. 3111, p. 472—481.
- Goodfellow M. Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus*, as *Rhodococcus fascians* comb. nov. Systematic and Applied Microbiology, 1984, vol. 5, p. 225—229.
- Kalinina L. V., Holt J. G., McGrath J. J. Identity of bacteria from Siberian permafrost soils // Abstract Book of 7-th Intern. Congr. of Bacteriology and Appl. Microbiology Division, Prague, 1994, p. 518.
- Klatte S., Rainey F. A., Kroppenstedt R. M. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. // Inter. J. Systematic Bacteriology, 1994, vol. 44, No 4, p. 769—773.
- Maintenance of microorganisms and cultured cells // Eds.: B. E. Kirsop, A. Doyle, London, Academic Press, 1984, 308 p.
- McWeigh H. P., Munro J., Embley T. M. Molecular evidence for the presence of novel actinomycete lineage in a temperate forest soil // J. Industrial Microbiol., 1996, vol. 17, p. 197—204.
- Minnikin D. E., Alshamaony L., Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates // J. of Gen. Microbiol., 1975, vol. 88, p. 200—204.
- Oppenheim J., Scheibuks J., Biava C. et al. Polyribosomes in *Azotobacter vinelandii* // Biochemistry and Biophysical Acta, 1968, vol. 161, p. 386—401.
- Palleroni N. J. Structure of bacterial genome // Handbook of new bacterial systematics, London, Academic Press Ltd, 1994, p. 57—113.
- Rowbotham T. J., Cross T. *Rhodococcus coprophilus* sp. nov.: an aerobic nocardioform actinomycete belonging to the «rhodochrous» complex // J. Gen. Microbiol., 1977, vol. 100, No 1, p. 123—138.
- Schleifer K. H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriological Review, 1972, vol. 36, p. 407—477.
- Shi T., Reeves R. H., Gilichinsky D. A. et al. Characterization of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing // Microbial Ecology, 1997, No 33, p. 169—179.
- Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O. et al. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. Emend // Inter. J. Systematic Bacteriology, 1995, vol. 45, No 4, p. 682—692.
- Stackebrandt E., Rainey F., Ward-Rainey N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov // Inter. J. Systematic Bacteriology, 1997, vol. 47, No 2, p. 479—491.
- Tai P.-C., Wallace B. J., Herzog E. L. et al. Properties of initiation-free polysomes of *Escherichia coli* // Biochemistry, 1973, vol. 12, p. 609—615.
- Vorobyova E., Soina V. Evaluation of the biochemical activity of permafrost deposits during thawing: physiological and biochemical characteristics of some isoplate microorganisms // Viable microorganisms in permafrost. Puchshino, 1994, p. 99—115.
- Williams S. T., Shameemullah M., Watson E. T. et al. Studies on the ecology of actinomycetes in soil // Soil Biology and Biochemistry, 1972, vol. 4, p. 215—225.
- Wilson G., Rose S. P., Fox C. F. The effect of membrane lipid unsaturation on glycoside transport // Biochemistry and Biophysical Research Commun., 1970, vol. 38, p. 617—723.
- Yokota A., Takeuchi M., Sakane T. et al. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium esteraromaticum* comb. nov. // Inter. J. Systematic Bacteriology, 1993, vol. 43, No 3, p. 555—562.

Поступила в редакцию
3 сентября 1997 г.