

БИОГЕОХИМИЯ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

**А.В. Брушков¹, В.П. Мельников¹, М.В. Щелчкова², Г.И. Грива³,
В.Е. Репин⁴, Е.В. Бреннер⁴, М. Танака⁵**

¹ Институт криосферы Земли СО РАН, 625000, Тюмень, ул. Малыгина, 86, Россия, brouchkov@hotmail.com

² Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова,
677000, Якутск, ул. Беллинского, 58, Россия, rector-svfu@ysu.ru

³ Тюменский научный центр СО РАН, 625000, Тюмень, ул. Малыгина, 86, Россия, brouchkov@hotmail.com

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, Россия, niboch@niboch.nsc.ru

⁵ Университет Хоккайдо, Кита 8, Ниши 5, Кита-ку, Саппоро, 060-0808, Япония, kouryu@general.hokudai.ac.jp

Многолетнемерзлые породы широко распространены в Северном полушарии, их возраст достигает сотен тысяч и миллионов лет. Они содержат живые микроорганизмы, которые из-за сравнительно высокой температуры среды (–2...–8 °С) не содержат льда, но находятся в иммобилизованном состоянии и, по-видимому, имеют возраст, близкий к возрасту мерзлоты. Из мерзлых неогеновых отложений Мамон-

товой горы был выделен штамм *Bacillus* sp. и идентифицирована его последовательность 16S rDNA. Из мерзлоты ледового комплекса выделена большая группа микроорганизмов, в том числе грибов. В мерзлых отложениях найдены инвертаза, уреазы и каталаза, а также дегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Свидетельства о биогеохимической активности мерзлоты и существовании в ней живых микроорганизмов появились давно [Лозина-Лозинский, 1972; Friedmann, 1994]. В 1979 г. на антарктической станции Восток обнаружены бактерии, грибы, диатомеи и другие микроорганизмы [Абызов и др., 1979]. Метаболизм бактерий был отмечен при низких температурах [Clein, Schimel, 1995]. Имеются другие факты выживания бактерий при температуре ниже 0 °С, а также в древних отложениях [Ashcroft, 2000; Nicholson et al., 2000; Katayama et al., 2007]. Микроорганизмы отличаются устойчивостью к замораживанию, многие из них легко его переносят [Лозина-Лозинский, 1972]. Известно, что при температурах ниже –20 °С часть воды (свыше 10 %) в материалах остается незамерзшей [Брушков, 1995].

Бактерии способны к длительному сохранению жизнеспособности. Показано, что споры сибирской язвы сохраняются около 105 лет [Ретин и др., 2008]. Получены колонии бактерий, которые были извлечены из янтаря возрастом 40 млн лет и более [Greenblatt et al., 1999]. Однако перечисленные единичные находки не дают полной уверенности в исключительной продолжительности выживаемости бактерий, которую дали исследования вечной мерзлоты. Территория вечной мерзлоты велика, только в Российской Федерации она занимает около 65 % площади. Она имеет температуры в основном –2...–8 °С, а ее возраст местами составляет миллионы лет [Геокриология..., 1988].

До настоящего времени достоверно не установлено, что микроорганизмы в мерзлых породах способны к развитию. Их рост затруднен из-за иммобилизованности клеток, недостаточного питания и плохой проводимости жидких прослоев в мерзлых породах. Даже в лабораторных условиях стареющие культуры, как известно, прекращают расти. Кристаллизация воды и остановка обмена веществ уменьшает способность к росту [Лозина-Лозинский, 1972]. Толщина прослоев незамерзшей воды при температурах –2 и –4 °С составляет приблизительно 0,01–0,1 мкм, что значительно меньше, чем размеры микроорганизмов. Эти проводящие пути практически непригодны для жизнеобеспечения, а заметный перенос клеток в мерзлых породах, очевидно, невозможен. Поэтому можно уверенно утверждать, что бактерии в многолетнемерзлых породах представляют собой ископаемые, реликтовые организмы. Их возраст подтверждается геологическими условиями залегания, историей формирования мерзлых толщ, результатами

изучения оптических изомеров аминокислот и, косвенно, биоразнообразием.

Природа длительной жизнеспособности микроорганизмов в древней мерзлоте не имеет исчерпывающего объяснения. Древняя дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) мумий, мамонтов, насекомых в янтаре и других организмов оказывается разрушенной. Расчеты показывают, что даже небольшие фрагменты ДНК (100–500 нуклеотидов) могут сохраняться не более 10 тыс. лет в обычном климате и максимум до 1 млн лет в холодных районах [Willerslev, Cooper, 2005]. Следует предположить существование механизмов, предотвращающих накопление повреждений. В настоящей работе описаны некоторые биогеохимические особенности мерзлых пород Якутии, главным образом на примере обнажения Мамонтова гора на Алдане, и приведены предварительные результаты исследования обнаруженных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования биогеохимических особенностей мерзлых пород были отобраны образцы из обнажений и подземных сооружений в нескольких районах. Одно из них расположено на левом берегу Алдана, в 325 км вверх по течению от его впадения в Лену, на Мамонтовой горе.

Река Алдан вскрывает здесь неоген-плейстоценовую (возраст от 16 млн до нескольких тысяч лет) толщу аллювиальных отложений, характеризующую период плейстоценовых оледенений. Неогеновая песчаная толща мерзлая, многолетнемерзлые породы находятся близко к поверхности или обнажены на участках эрозии. Криогенное строение указывает на эпигенетическое промерзание (после формирования и литификации осадков) неогеновой толщи. В среднеплейстоценовых песчаных отложениях присутствуют следы сингенетического промерзания (ледяные и земляные грунтовые жилы), расположенные на разных уровнях. Это свидетельствует о возможном непрерывном существовании мерзлых толщ в течение плейстоцена и, соответственно, о вероятном значительном возрасте микроорганизмов, найденных в этих отложениях. Неоген-среднеплейстоценовая песчаная толща перекрывается верхнеплейстоценовыми суглинками и илами, вмещающими повторно-жильные льды. Мощность отложений с повторно-жильными льдами достигает 7–10 м.

Образцы были отобраны в 0,9–1,0 м глубже слоя сезонного оттаивания (который составлял в

условиях непрерывной эрозии не более нескольких сантиметров) в вертикальных стенках речных обрывов. Обнажение разрушается рекой (свыше нескольких метров в год), так что отложения, из которых отбирались образцы, находились, очевидно, в многолетнемерзлом состоянии. При этом происходит ежегодное весеннее смывание обрушений, предотвращающее завалы и смещения пород. Породы представляют собой тонкозернистые пески, их возраст соответствует среднему миоцену и составляет 10–12 млн лет [Баранова и др., 1976]. Похолодание и промерзание отложений началось здесь, по-видимому, в конце плиоцена, около 3–3,5 млн лет назад [Бакулина, Спектор, 2000]. Позднее отложения, вероятно, не оттаивали из-за холодного климата Якутии. По данным палеоклиматических реконструкций региона среднегодовые температуры в плейстоцене составляли от –12 до –32 °С зимой и от +12 до +16 °С летом [Бакулина, Спектор, 2000]. Таким образом, возраст мерзлоты на Мамонтовой горе может достигать 3,5 млн лет. Кроме этого, образцы были отобраны из более молодых повторно-жильных льдов Якутии, из подземелья Института мерзлотоведения СО РАН в Якутске, а также из мерзлых пород на левобережье Лены в районе стационара Нелегер.

Пробы мерзлых пород отбирались с максимально возможными для полевых условий предосторожностями. Для микроструктурных исследований отбирались монолиты мерзлых пород 4–5 кг, для микробиологических – около 50 г. Для отбора использовались стерилизованные спиртом и обожженные в пламени металлические инстру-

менты. Образцы помещались в стерильную упаковку и перевозились в термоконтейнерах с хладагентами при температуре –5 °С, что близко к естественным условиям.

Физико-химические свойства проб определяли общепринятыми в почвоведении методами: общее содержание органического вещества и гумуса – мокрым сжиганием по Тюрину; карбонаты – газометрически; рН – потенциометрически; полевая влажность – весовым методом; гранулометрический состав – по методу Качинского. В пробах определяли активность почвенных ферментов гидролаз (инвертазы, уреазы, фосфатазы) и оксидоредуктаз (дегидрогеназы и каталазы) по стандартным методикам [Щелчкова, 2009]. Предварительно каждую пробу в мерзлом состоянии измельчали, перемешивали и затем брали навески для анализа. Органические остатки из проб не удаляли. Повторность анализа трехкратная. Список исследованных образцов на ферментативную активность приведен в табл. 1. Физико-химические свойства отложений 50-метровой террасы Мамонтовой горы приведены в табл. 2.

Образцы различного разведения в стерильных условиях добавлялись в чашки Петри, содержащие среды YPD, MRS и NA. Образцы добавлялись также в жидкий мясопептонный бульон в анаэробных и аэробных условиях.

ДНК извлекалась с помощью Fast DNA kit for soil (BIO 101 Inc., Vista, CA). Фрагменты генов 16S rRNA были амплифицированы полимеразной цепной реакцией (ПЦР), проводимой с бактериальными праймерами. ПЦР проводилась в объеме

Таблица 1. Описание образцов и датировки по [Разрез..., 1973]

№ образца	Возраст	Описание
2	Верхний плейстоцен	Покровный суглинок, на 20 см выше контакта с горизонтом с повторно-жильными льдами. Тяжелый суглинок с большим количеством корней, растительными остатками, плотный, мерзлый, светло-коричневый, при оттаивании пластичный. Криотекстура волнисто-слоистая, толщина шпиров 1–3 мм, видимая льдистость примерно 50 %
3	Верхний плейстоцен	Отложения, вмещающие повторно-жильные льды. Ниже контакта с покровными суглинками примерно на 1 м
5	Средний плейстоцен	Примерно 8 м вниз от вершины склона, 10 м от места отбора пробы № 6. Вскрывается песок серый с прослоями светло-серого песка. Криотекстура массивная. Имеются темные пятна органики. Приблизительный возраст 150 тыс. лет назад
6	Средний плейстоцен	Левый борт распадка ближнего обнажения, перед ближним цирком, верхняя часть склона, примерно 10 м от вершины. Суглинок серый, мерзлый с неразложившимися остатками растительности, в том числе зелеными стеблями. Криотекстура массивная с линзами льда толщиной примерно 1 см. Ледяная жила среднего плейстоцена, после зачистки достаточно четкая. Над ней прослеживается грунтовая жила. Приблизительный возраст 150 тыс. лет назад
7	Средний плейстоцен	Средняя часть склона террасы, под обнажением, где взяты пробы № 1–6, примерно 25 м вверх от уреза воды, шурф. Вскрывается песок серый среднезернистый, чередуется горизонтальная и косая слоистость. Ниже залегает галечник. Датировка над галечником 300 тыс. лет назад
8	Миоцен	Начало 50-метровой террасы, примерно 90 м от левой части устья ручья Аан-Аппа, вниз по течению р. Алдан. Обнажение неогенового песка. Шурф заложен примерно в 25 м вверх от уреза воды. Пески серые, переслаиваются темно-серые и желтоватые пески, среднекрупнозернистые. Косая слоистость смешивается с горизонтальной слоистостью – много “несогласий”. Имеется прослой галечника мощностью до 20 см, над ним имеется горизонт из погребенных остатков древесины, проба взята из него. Приблизительный возраст 12 млн лет назад

Таблица 2. Физико-химические свойства отложений 50-метровой террасы Мамонтовой горы

Образец	рН водн.	Общий углерод, %	Гумус, %	СаСО ₃ , %	Полная влажность, %	Гигроскопич. влажность, %	Удельный вес	Количество частиц диаметром, мм					Сумма частиц	
								1–0,25	0,25–0,05	0,05–0,01	0,01–0,005	0,005–0,001	<0,001 мм	<0,01 мм
2	8,02	1,66	2,86	4,76	60,26	0,24	2,58	0,7	13,5	42,9	12,2	13,5	17,2	42,9
3	8,14	1,47	2,53	2,20	72,83	2,38	2,48	0,6	7,5	44,5	15,5	13,5	18,4	47,4
5	7,83	0,69	1,19	0	24,97	0,22	2,62	54,7	22,8	8,5	1,7	1,6	10,7	14,0
6	8,10	1,27	2,19	0	75,12	1,81	2,50	7,8	9,7	33,0	12,3	14,7	22,5	49,5
7	7,63	0,04	0,07	0	29,79	0,11	2,70	71,0	26,1	1,0	0,4	0,6	0,9	1,9
8	4,84	1,25	2,16	0	32,60	0,08	2,63	69,3	21,0	3,5	1,2	2,3	2,7	6,2

20 мкл с помощью GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), ампликоны подвергались электрофорезу и очищению с помощью Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Очищенные ампликоны были клонированы с использованием pCR2.1 вектора, культуры *E. coli*, а также TA cloning kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя. Из суточной культуры ДНК плазмид, содержащая 16S rDNA, получена с помощью Mini prep spin kit (Quiagen, Crawley, UK). Очищенные ДНК плазмид секвенировали на ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer с помощью Big Dye Terminator cycle-sequencing kit (Applied Biosystems). Длина последовательностей достигала 1488 bp. Полученные последовательности сравнивались с другими при помощи BLAST. Филогенетическое дерево строилось с использованием CLUSTAL W software package.

СПОРОВО-ПЫЛЬЦЕВОЙ АНАЛИЗ ОТЛОЖЕНИЙ

В мерзлых плейстоценовых отложениях 50-метровой террасы Мамонтовой горы доминирует пыльца древесно-кустарниковых растений (50,8 %), представленная почти в равных соотношениях пыльцой хвойных (26,0 %) и мелколиственных (24,8 %) растений. Среди голоосеменных доминирует пыльца лиственницы *Larix* (15,6 %), меньше пыльцы сосны обыкновенной *Pinus silvestris* (6,8 %), еще меньше кедрового стланика *Pinus pumila* (2,0 %) и ели *Picea* (1,4 %) – *P. obovata* и *P. cf. ajanensis*. В составе мелколиственных преобладает пыльца кустарниковых растений: ольховник *Alnaster* (13,0 %), березка тощая *Betula exilis* (4,2 %), ива *Salix* (1,4 %). Пыльца древовидной березы встречается в количестве 6,2 % (*Betula sect. Albae*, *B. platyphylla*). Группа травяно-кустарниковых растений составляет 48,6 %. Абсолютно преобладает пыльца полыни *Artemisia* (41,1 %) – типичного представителя сухих степенных участков. В целом сравнение ископаемых спектров с современными показывает следующее. Судя по одним образцам, климат в период формирова-

ния осадков временами был холодней и, возможно, суше, чем современный, а временами, как показывают другие пробы, – несколько теплее и влажнее современного.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕРЗЛЫХ ПОРОД

Исследование ферментативной активности древних вечномерзлых отложений проводили в сравнении с ферментативной активностью современных мерзлотных почв. Для этого была составлена выборка из девяти типов почв, широко распространенных в среднетаежной подзоне Центральной Якутии [Щелчкова, 2009]. В нее вошли лесные (мерзлотные палевые) и луговые (мерзлотные черноземовидные, дерново-глеевые и аласные) почвы.

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что современные мерзлотные почвы обладают всем спектром изученных нами гидролаз и оксидоредуктаз. Наличие в почвах гидролитических ферментов углеводного, азотного и фосфорного обмена свидетельствует о протекающих в них процессах расщепления органических веществ и обогащения почв моносахарами и минеральными соединениями фосфора и азота. Гумусово-аккумулятивные горизонты мерзлотных почв богаты инвертазой. Активность уреазы варьирует сильнее, поэтому среди мерзлотных почв встречается как бедные, так и среднеобогатенные и богатые уреазой. В отличие от гидролитических ферментов дегидрогеназа наряду с ферментами фенолосидазного комплекса участвует в окислительно-восстановительных реакциях биогенеза гумуса и в определенной степени отражает интенсивность процессов гумификации в почвах. Мерзлотные почвы Центральной Якутии бедны или обогатены в средней степени дегидрогеназой. Таким образом, в современных почвах осуществляются основные стадии трансформации органики (распад органических соединений и гумификация), характерные для процесса почвообразования.

Каталазная активность является одним из показателей биологической активности почв. Роль

Таблица 3. Ферментативная активность мерзлотных почв Центральной Якутии

Горизонт	Глубина, см	Инвертаза, мг глюкозы/(г·ч)	Уреаза, мг NH ₄ ⁺ /(г·24 ч)	Фосфатаза, мг ФФ/(г·ч)	Дегидрогеназа, мг ТФФ/(10 г·24 ч)	Каталаза, мл О ₂ /(г·мин)
<i>Мерзлотная палевая деформированная высококовшипающая</i>						
A	0–5(9)	0,57	1,36	0,576	3,860	1,3
B	28–38	0,25	0,30	0	1,244	1,1
BC _{ca}	50–70	0,27	0,01	0	0	0
<i>Мерзлотная палевая осолодевая</i>						
A	0–6	2,62	37,77	8,98	–	11,42
B	10–30	0,45	3,86	0,97	–	0,55
BC	50–100	0,03	1,58	0	–	0,14
<i>Аласная дерново-сапропелево-глеевая</i>						
A	0–22	0,55	10,81	14,91	–	5,04
LD ₁	22–40	0,29	8,45	0	–	0,81
LD ₂	40–68	0,26	7,66	0	–	1,09
<i>Аласная дерново-луговая</i>						
LD ₁	0–23	1,34	13,45	0,81	–	3,07
LD ₂	23–40	0,09	9,19	0	–	0,79
B _{ca}	50–110	0,33	0	0	–	0,33
<i>Аласная остепненная</i>						
LD ₁	0–19	0,81	2,06	0,88	–	4,95
B _{ca}	19–103	0,42	0,77	0	–	0,07
<i>Мерзлотный чернозем</i>						
A	0–19	2,95	5,00	5,25	4,15	1,60
B	47–72	0,74	0,40	0	0	0,69
C	72–102	0,49	0,20	0	0	0,54
<i>Мерзлотная лугово-черноземная</i>						
A	0–12(14)	4,23	2,86	3,37	3,00	2,54
B _{ca}	45–80	0,81	0,22	0	0	0,57
C	80–100	0,55	0,10	0	0	0,13
<i>Мерзлотная дерново-глеевая</i>						
A	3–18	3,03	1,16	1,27	2,75	1,58
B _g	58–70	0,21	0,36	0,49	0	0,40
C	70–90	0,23	0,25	0,43	0	0,20
<i>Мерзлотная переходная от луговой к лесной</i>						
A	2–21	3,29	1,31	5,58	1,70	2,27
B _{ca}	37–78	0,65	0,15	0	0	0,10
BC	80–100	0,35	0,12	0	0	0,03

почвенной каталазы, как и внутриклеточной, сводится к разрушению токсичной для живых организмов перекиси водорода. Как правило, активность каталазы в почвах определяется содержанием органического вещества и количеством микроорганизмов. Мерзлотные почвы по каталазной активности оцениваются как бедные и среднеобогатенные. Вниз по профилю почв активность всех ферментов закономерно убывает в соответствии со снижением содержания органического вещества и уменьшением общей биогенности. При этом инвертазой, уреазой и каталазой обогащен весь почвенный профиль, а активность фосфатазы и дегидрогеназы выявляется преимущественно в верхних гумусово-аккумулятивных горизонтах

(см. табл. 3). Связь дегидрогеназы с гумусово-аккумулятивными горизонтами отражает функциональную роль данного фермента и свидетельствует о том, что именно в этом горизонте активно протекают реакции гумификации. Приуроченность фосфатазы только к верхнему слою почв указывает на заторможенность фосфорного обмена в мерзлотных почвах. Известно, что общей особенностью мерзлотных почв является слабая обеспеченность минеральным фосфором. Мерзлотные почвы Центральной Якутии преимущественно бедны или обогащены в средней степени гидролитическими и окислительно-восстановительными ферментами, активность которых наиболее высока в верхних гумусово-аккумулятивных горизон-

Таблица 4. Статистические показатели ферментативной активности мерзлотных почв Центральной Якутии

Фермент	Горизонт	<i>n</i>	$M \pm m$	Lim	$M \pm tm$ ($p = 0,05$)
Инвертаза	A	9	2,535±0,454	0,55–4,24	1,65–3,42
	B	9	0,499±0,084	0,09–0,81	0,34–0,66
	BC (C)	8	0,314±0,057	0,03–0,55	0,20–0,42
Уреаза	A	9	8,421±3,959	1,16–37,77	0,66–16,18
	B	9	2,633±1,233	0,15–8,45	0,22–5,05
	BC (C)	8	1,240±0,935	0–7,66	0–3,07
Фосфатаза	A	9	4,625±1,598	0,58–14,91	1,49–7,94
	B	9	0,054±0,054	0–0,49	0–0,16
	BC (C)	9	0,048±0,048	0–0,43	0–0,09
Дегидрогеназа	A	5	3,092±0,435	1,70–4,15	2,24–3,94
	B	5	0,249±0,242	0–1,24	0–0,74
	BC (C)	5	0±0	0–0	0–0
Каталаза	A	9	3,686±1,085	0,70–11,42	1,56–5,81
	B	9	0,564±0,055	0,07–1,10	0,36–0,77
	BC (C)	8	0,308±0,127	0–1,09	0,06–0,56

Примечание. *n* – количество проб; $M \pm m$ – среднее арифметическое; Lim – пределы колебаний; $M \pm tm$ (при вероятности $p = 0,05$) – доверительный интервал.

Таблица 5. Ферментативная активность отложений 50-метровой террасы

№ образца	Геологич. период	Инвертаза, мг глюкозы/(г·ч)	Уреаза, мг NH_4^+ /(г·24 ч)	Фосфатаза, мг ФФ/(г·ч)	Дегидрогеназа, мг ТФФ/(10 г·24 ч)	Каталаза, мл O_2 /(г·мин)
2	Верхний плейстоцен	0,644	0,164	0	0	0,2
3	Верхний плейстоцен	0,690	0,043	0	0	0,2
5	Средний плейстоцен	0,362	0,042	0	0,361	0
6	Средний плейстоцен	0,684	0	0	3,225	0,1
7	Средний плейстоцен	0,399	0	0	0	0
8	Миоцен	0,155	0	0	0	0

тах. На основе полученных данных нами рассчитаны статистические показатели ферментативной активности мерзлотных почв для трех горизонтов – А, В и ВС (С): средние арифметические, пределы колебаний и доверительные интервалы (табл. 4). Представляется целесообразным использовать статистические параметры для сравнения их с ферментативной активностью вечномерзлых отложений. Результаты исследования активности ферментов в осадочных отложениях, слагающих 50-метровую террасу, приведены в табл. 5. Они показывают, что в мерзлых толщах, имеющих возраст от 30 тыс. до 12 млн лет, обнаруживается активность некоторых из изученных нами ферментов. Активность инвертазы выявлена во всех изученных нами пробах. Наиболее высока активность инвертазы в отложениях верхнего и среднего плейстоцена. По абсолютным значениям она сопоставима с активностью инвертазы в мине-

ральных горизонтах В современных мерзлотных почв (см. табл. 4, 5). Уреазная активность из шести исследованных проб обнаружена лишь в трех пробах (№ 2, 3, 5), принадлежащих к отложениям верхнего и среднего плейстоцена. Ее значения укладываются в доверительный интервал уреазной активности минеральных горизонтов В и ВС современных мерзлотных почв Центральной Якутии (табл. 6). Дегидрогеназная активность зарегистрирована в двух пробах из шести, относящихся к отложениям среднего плейстоцена. В пробе № 5 она относительно низкая и соответствует таковой в минеральных горизонтах современных мерзлотных почв, а в пробе № 6 активность дегидрогеназы достаточно высокая (3,225 мг ТФФ/(10 г·24 ч)) и входит в доверительный интервал дегидрогеназной активности гумусово-аккумулятивных горизонтов почв. Каталазную активность проявляли пробы верхнеплей-

Таблица 6. Корреляционная связь (r) ферментативной активности с некоторыми физико-химическими свойствами многолетнемерзлых отложений

Параметр	Инвертаза	Уреаза	Дегидрогеназа	Каталаза
Физическая глина	0,910789*	0,422323***	0,478089***	0,882493*
Ил	0,872943*	0,376933	0,579961***	0,768905**
Мелкая пыль	0,892061*	0,435522***	0,460784***	0,899808*
Гумус	0,445122***	0,524052***	0,137730	0,751701**
Общий углерод	0,447233***	0,525079***	0,137399	0,753424**

П р и м е ч а н и е. r -достоверен с вероятностью: * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,2$.

стоценового возраста и одна из трех проб среднеплейстоценового возраста. В них активность каталазы оценивается как низкая, соответствующая минеральным горизонтам ВС и почвообразующим породам современных мерзлотных почв. Фосфатазная активность в древних вечномерзлых отложениях 50-метровой террасы Мамонтовой горы не наблюдается.

Полученные результаты показывают, что в мерзлых отложениях наилучшим образом сохраняется инвертаза. Активность этого фермента выявляется в пробах всего возрастного спектра – от миоцена до верхнего плейстоцена. В меньшей, по сравнению с инвертазой, степени сохраняются уреазы, дегидрогеназы и каталазы. Активность этих ферментов выявлена лишь в отложениях верхнего и среднего плейстоцена, причем она регистрируется не во всех изученных пробах. Фосфатаза в древней мерзлоте не обнаружена.

В стратиграфическом профиле 50-метровой террасы активность инвертазы, уреазы и каталазы в целом проявляет тенденцию к снижению по мере увеличения возраста отложений. При этом пробы, имеющие суглинистый гранулометрический состав и обогащенные органическим веществом, имеют более высокую ферментативную активность по сравнению с пробами супесчаного и песчаного гранулометрического состава (см. табл. 6). Обнаружена прямая положительная связь между инвертазной и каталазной активностью и содержанием физической глины, ила, мелкой пыли (коэффициент корреляции $r = 0,769-0,911$), между каталазной активностью и содержанием органического вещества и гумуса ($r = 0,752$). Прямая положительная связь средней силы выявлена между инвертазной активностью и содержанием гумуса и органического вещества ($r = 0,445-0,447$), между уреазной активностью и содержанием органики и тонкодисперсных минеральных частиц ($r = 0,422-0,525$) и между дегидрогеназной активностью и содержанием физической глины, ила и мелкой пыли. Наличие таких корреляционных связей объясняется тем, что в почвенной среде ферменты находятся преимущественно в иммобилизованном состоянии, т. е. связаны с поверхностью тонкодисперсных органических и минеральных частиц.

Наиболее высокой адсорбирующей способностью обладают минеральные частицы диаметром менее 0,001 мм (илистая фракция и коллоиды, по Н.А. Качинскому) в силу своей высокой дисперсности и преобладания в их составе глинистых минералов и гумуса. Ферменты, поступая в почву, стабилизируются на почвенных минералах и органических веществах путем образования ионных, водородных и ковалентных связей. Связь ферментов с органоминеральными коллоидами может быть очень прочной, что, в свою очередь, определяет устойчивость белковых молекул к неблагоприятным факторам среды (например, к микробному протеолизу) и способствует их сохранности во времени. Низкие температуры многолетнемерзлых отложений также приостанавливают деятельность микроорганизмов и способствуют сохранению иммобилизованных ферментов. Проведенное нами ранее изучение термодинамических показателей активной инвертазы в погребенных горизонтах из отложений верхнего плейстоцена показало, что в них инвертаза находится в двух состояниях – свободном и связанном. Причем иммобилизованная инвертаза характеризуется высокой энергией активации и термостабильностью [Ashcroft, 2000]. Дегидрогеназа, в отличие от инвертазы, уреазы и каталазы, является мембраносвязанным ферментом. Она не выделяется бактериями в окружающую среду подобно внеклеточным гидролазам. Поэтому ее присутствие в вечномерзлых отложениях может указывать на наличие в них живых или мертвых клеток бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В мерзлых миоценовых отложениях на Мамонтовой горе была обнаружена культивируемая бактерия, способная к аэробному и анаэробному росту; оптимальная температура роста определена в +37 °С. Она представляет собой сравнительно большую (1,0–1,5 × 3–6 мкм) палочку, которая в культуре соединяется в цепи (рис. 1) и способна образовывать споры. Она неподвижна и грамположительна. Микроорганизм принадлежит роду *Bacillus*, но, по-видимому, является новым видом. Нуклеотидная последовательность 16S rRNA ба-

циллы была депонирована в DDBJ/EMBL/GenBank под номером AB178889, идентификационный номер 20040510203204.24251. Наибольшее видовое подобие выделенной бациллы отмечено с *Bacillus simplex*, *B. macroides*, гомология с 16S rRNA которых составляет 96–97 %.

Рост бацилл при низких температурах наблюдался ранее [Ashcroft, 2000]. Известно, что *Bacillus anthracis* легко переносит замораживание [Penin и др., 2008]. Оптимальная температура роста найденной бациллы довольно высокая. Споры бацилл известны как наиболее резистентные [Nicholson et al., 2000]. Так, *B. thuringiensis* и *B. macroides* были найдены в янтаре с абсолютным возрастом 120 млн лет [Greenblatt et al., 1999]. Поэтому находка живой бациллы в древней мерзлоте Мамонтовой горы в целом не удивительна. Споры характерны для грамположительных родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* и др. [Nicholson et al., 2000], а в последнее время стало известно, что их образуют и грамотрицательные микроорганизмы, так что спорообразование широко распространенный механизм выживания, в котором, возможно, участвует горизонтальный перенос генетической информации.

Из древних мерзлых неогеновых отложений Мамонтовой горы получен ряд культур других микроорганизмов (рис. 2, 3). Для некоторых культур выполнено выделение ДНК, проведены ПЦР и секвенирование 16S рибосомальной ДНК, они оказались близки к следующим видам: *Planococcus* sp. Tibet-IIVa1, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Bacillus mojaviensis*, *Jeotgalicoccus psychrophilus*, *Psychrobacter pulmonis* и др. Некоторые основные биохимические свойства штаммов, выделенных из древних мерзлых отложений Мамонтовой горы, приведены в табл. 7.

В подземелье Института мерзлотоведения, на глубине около 7 м на стенах найден белый гриб-

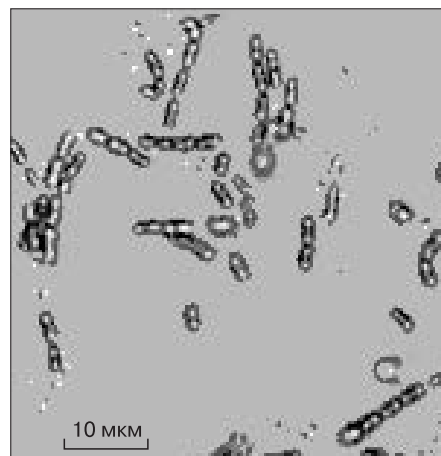


Рис. 1. Выделенный штамм *Bacillus F* (окраска по Граму).

ной мицелий. Похожий мицелий наблюдается и на стенках тоннеля Фокс на Аляске. Идентификация выделенного вида (штамм PF) была основана на его морфологических характеристиках и анализе последовательности нуклеотидов, амплифицированной 18S rRNA; он близок к *Penicillium echinulatum* и, возможно, представляет собой новый вид. Образцы из мерзлых отложений были подготовлены вместе с образцами штаммов *P. echinulatum*, полученных из банка культур, и инкубируются при температурах 25, 5 и -5°C . Характеристики прорастания спор и роста штамма PF из мерзлых отложений и штаммов IFO 7760 и IFO 7753 *P. echinulatum* при более низких температурах оказались различными: штамм PF сравнительно быстро рос при -5°C . Интересно, что при температуре -5°C выделенный штамм рос в чашках Петри – как в тех, где произошла кристаллизация среды, так и в переохлажденной среде (картофель-

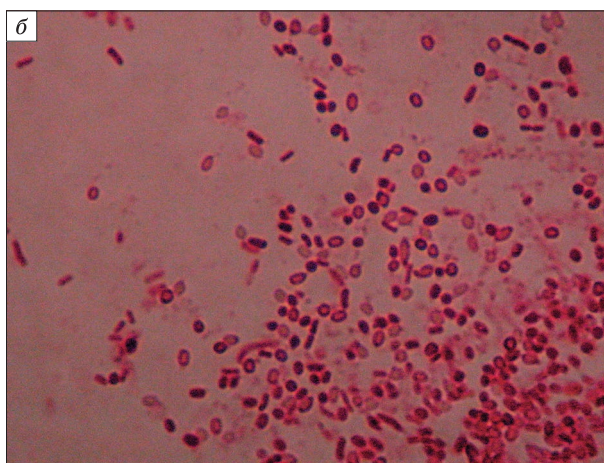
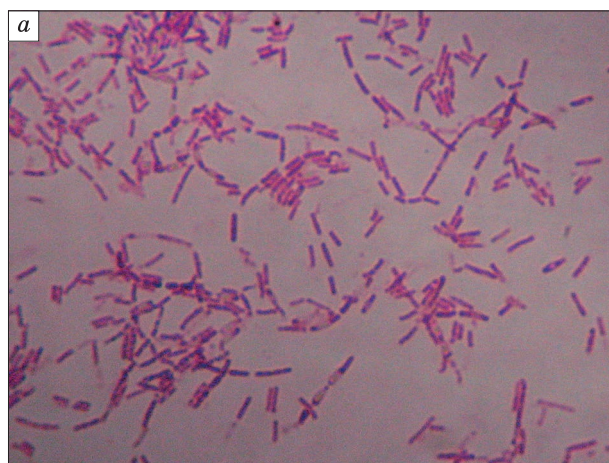


Рис. 2. Морфология клеток бактериальных штаммов 17 (а) и 40 (б), выделенных из мерзлых песчаных отложений неогена Мамонтовой горы (окраска по Граму, увел. 1500).

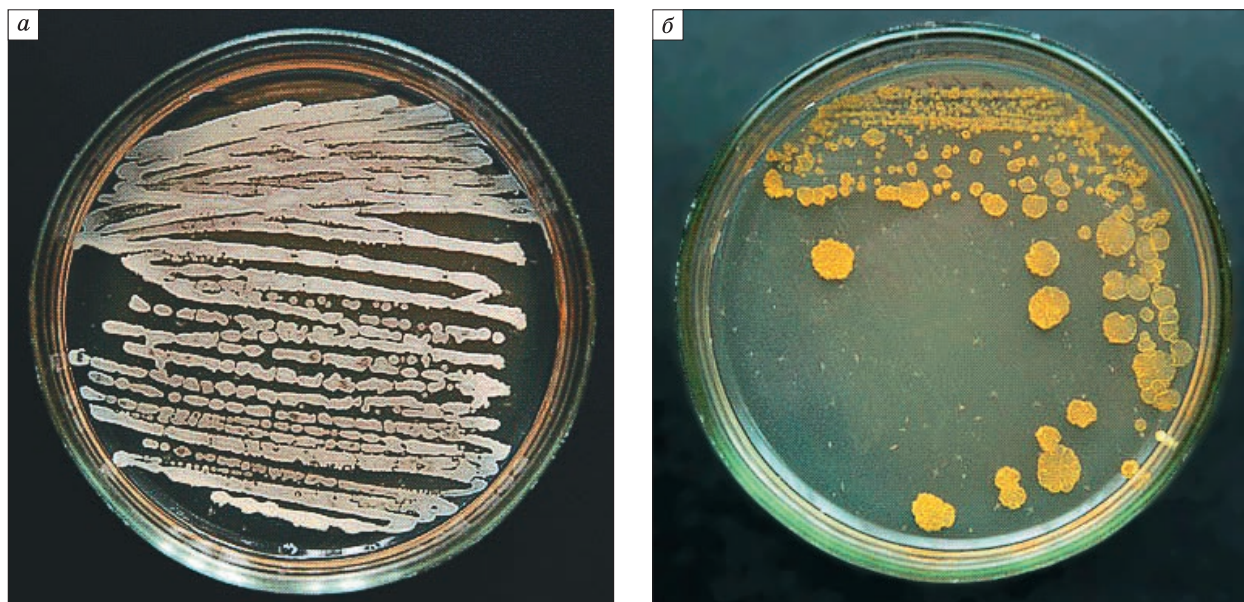


Рис. 3. Колонии бактериальных штаммов 6 (а) и 27 (б), выделенных из мерзлых песчаных отложений неогена Мамонтовой горы.

ном агаре). При этом на кристаллизованной среде он рос быстрее. Выделенный штамм *Penicillium echinulatum* в подземелье Института мерзлотоведения в Якутске, несмотря на его адаптацию к холоду и условиям питания, вполне может быть современным, занесенным с поверхности. Кроме того, этот гриб растет только в аэробных условиях. Поэтому и его способность к росту в мерзлоте сомнительна.

Из значительно более молодых повторно-жильных льдов Якутии и Аляски возрастом около 25–40 тыс. лет по описанной выше методике нами были выделены уже десятки видов микроорганизмов [Katayama et al., 2007]. Большинство из выделенных бактерий грамположительны и близки к *Arthrobacter* и *Micrococcus* spp., а грибы – к *Geomyces* sp.

Интересны в этом смысле данные по времени жизни наиболее устойчивого среди вирусов вируса натуральной оспы. Показано, что это время совпадает с приведенными расчетными данными и составляет несколько сотен лет [Ретин и др., 2008]. Особый интерес, конечно, представляют микроорганизмы, сохраняющиеся в природных условиях при низких температурах длительное время [Friedmann, 1994; Katayama et al., 2007]. Прослеживается возможность комбинаторных преобразований, предсказанных ранее [Ретин и др., 2008]. Нельзя не отметить в этом аспекте существование таких биокатализаторов, как рибозимы. В данном случае может оказаться важным, что рибозимы стабильны и активны при температуре ниже 0 °С. Большое разнообразие реликтовых микроорганизмов,

выделенных из ледяной жилы возрастом 25–40 тыс. лет [Katayama et al., 2007], возможно, объясняется кодированием свойства длительной жизнеспособности мобильными генетическими структурами типа плазмид.

Таким образом, продолжительное существование микроорганизмов трудно объяснить замедлением жизнедеятельности при анабиозе. Если бактерии образуют споры, в которых метаболизм практически остановлен [Nicholson et al., 2000], то приведенные выше расчеты по денатурации, хотя бы только ДНК, тем более уместны. Многообразие механизмов повреждения ДНК (метилование, дезаминирование, апуринизация, образование тиминных димеров, сшивок и разрывов) приводит в рамках данной гипотезы к переоценке времени жизни макробиомолекул, еще более сокращая ее продолжительность. Очевидно, что выживание обусловлено наличием особых репарационных или консервационных механизмов.

ВЫВОДЫ

1. Из вечной мерзлоты Мамонтовой горы, возраст которой достигает около 3,5 млн лет, выделен и идентифицирован по 16S rDNA штамм *Bacillus* sp. F, а также ряд других микроорганизмов. Для мерзлоты более молодого возраста (25–40 тыс. лет) характерно содержание большой группы микроорганизмов, в том числе грибов.

2. Низкие температуры вечномерзлых отложений приостанавливают деятельность микроорганизмов и способствуют сохранению иммобили-

Таблица 7. Биохимическая активность штаммов, выделенных из древних мерзлых отложений Мамонтовой горы

Показатель		Штамм													
		6	13	15	17	20	27	29	30	32	33	34	37	40	F
Окраска по Граму		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пигментация		желт.	-	-	-	-	-	-	-	желт.	-	желт.	-	-	-
Спора:	форма	-	С, Э	С, Э	Э	Э	Э	Э	Э	-	-	-	-	Э	Э
	расположение	-	Ц, Т	Ц, Т	Ц	Ц	Ц	Ц	Ц	-	-	-	-	Ц	Ц
	раздутость спорангия	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост в анаэробных условиях		+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Каталазная активность		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Оксидазная активность		+	+	+	+	+сл	+сл	+сл	+	+	+сл	+сл	+сл	-	+сл
Тест Фогес–Проскауэра		-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Использование цитрата		-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Редукция нитратов		+	+газ	+газ	+газ	+	+	+газ	+газ	+газ	+газ	+газ	+газ	+	+газ
Гидролиз	казеина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	желатина	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	крахмала	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Образование кислоты из:	глюкозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	маннита	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	арабинозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ксилозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	лактозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	маннозы	-	+	+	+	+сл	+	+	+	-	-	+сл	-	+	+
	сорбита	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рост при условиях:	2 °С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 °С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	43 °С	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	6,5 % NaCl	+сл	+сл	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+сл
	10 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pH 5	-	+сл	+сл	+сл	-	-	+сл	-	+	-	-	-	+сл	+сл
	pH 5,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	pH 8,5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	pH 10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
pH 10,5	-	+	+	+	+	+сл	+	+	-	+сл	-	-	+	+	
pH 11	-	+	+	+	+	+сл	+	+	-	+сл	-	-	+сл	+сл	
Образование на МПБ:	аммиака	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H ₂ S	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

Примечание. С – сферическая спора; Э – эллипсоидная спора; Ц – центральное расположение споры; Т – терминальное расположение споры; “минус” – отрицательная реакция, “плюс” – положительная реакция, +сл – слабоположительная реакция.

зованных ферментов. В мерзлых отложениях содержится инвертаза, уреазы и каталазы, а также дегидрогеназа. Последняя является мембраносвязанным ферментом, не выделяется бактериями в окружающую среду, и ее присутствие в вечномерзлых отложениях может указывать на наличие в них живых или мертвых клеток бактерий.

Авторы выражают благодарность академику В.В. Власову (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за поддержку настоящей работы и полезные дискуссии, а также сотрудникам Министерства экологии Республики Саха (Якутия) за помощь в организации и проведении полевых работ.

Литература

- Абызов С.С., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б.** Микробиологические исследования ледника в Центральной Антарктиде // Изв. АН СССР. Сер. биол., 1979, № 6, с. 828–836.
- Бакулина Н.Т., Спектор В.Б.** Реконструкция климатических параметров неогена Якутии по палинологическим данным // Климат и мерзлота. Якутск, ИМЗ СО РАН, 2000, с. 21–32.
- Баранова Ю.П., Ильинская И.А., Никитин В.П. и др.** Миоцен Мамонтовой горы // Труды ГИН СО АН СССР. М., Наука, 1976, вып. 233, 284 с.
- Брушков А.В., Власов А.Н., Мерзляков В.П., Талонов А.В.** Влияние локальных фазовых переходов на деформируемость пластично-мерзлых грунтов // Геозкология. Инж. геология, гидрогеология, геокриология, 1995, № 5, с. 71–77.
- Геокриология СССР.** Европейская территория СССР / Под ред. Э.Д. Ершова. М., Недра, 1988, 358 с.
- Лозина-Лозинский Л.К.** Очерки по криобиологии. Л., Наука, 1972, с. 288.
- Разрез** новейших отложений Мамонтова гора / Под ред. К.К. Маркова. М., Изд-во Моск. ун-та, 1973, 190 с.
- Репин В.Е., Пугачев В.Г., Таранов О.С. и др.** Потенциальная опасность микроорганизмов, пришедших из прошлого // Юкагирский мамонт / Ред. Г.Г. Боескоров, А.Н. Тихонов, Н. Сузуки. СПб., Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2008, с. 183–190.
- Щелчкова М.В.** Термодинамические показатели активной инвертазы из погребенных почвенных горизонтов позднелейстоценового возраста севера Якутии // Сиб. экол. журн., 2009, № 2, с. 195–201.
- Ashcroft F.** Life at the Extremes. Berkeley, Univ. of California Press, 2000, 326 p.
- Clein J.S., Schimel J.P.** Microbial activity of tundra and taiga soils at sub-zero temperatures // Soil Biol. Biochem., 1995, No. 27, p. 1231–1234.
- Friedmann E.I.** Permafrost as microbial habitat // Viable Microorganisms in Permafrost. Pushchino, Rus. Acad. of Sci., 1994, p. 21–26.
- Greenblatt C.L., Davis A., Clement B.G. et al.** Diversity of microorganisms isolated from amber // Microbial Ecol., 1999, No. 38, p. 58–68.
- Katayama T., Tanaka M., Moriizumi J. et al.** Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25,000 Years // Appl. Environ. Microbiol., 2007, No. 4, p. 2360–2363.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G. et al.** Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000, No. 64, p. 548–572.
- Willerslev E., Cooper A.** Ancient DNA // Proc. Roy. Soc. B., 2005, No. 272, p. 3–16.

*Поступила в редакцию
10 февраля 2011 г.*