

## БИОГЕОХИМИЯ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

А.В. Брушков<sup>1</sup>, В.П. Мельников<sup>1</sup>, М.В. Щелчкова<sup>2</sup>, Г.И. Грива<sup>3</sup>,  
В.Е. Репин<sup>4</sup>, Е.В. Бреннер<sup>4</sup>, М. Танака<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова,  
677000, Якутск, ул. Белинского, 58, Россия, rector-svfu@ysu.ru

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

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

<sup>5</sup> 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 ( $-2\ldots-8^{\circ}\text{C}$ ) 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, уреаза 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 [Репин 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 прослоек 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 весенне 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 °C зимой и от +12 до +16 °C 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 термоконтеинерах с хладагентами при температуре –5 °C, что близко к естественным условиям.

Физико-химические свойства проб определяли общепринятыми в почковедении методами: общее содержание органического вещества и гумуса – мокрым сжиганием по Тюрину; карбонаты – газометрически; pH – 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 [Щелкова, 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 шлиров 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 прослойками 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, %	CaCO <sub>3</sub> , %	Полевая влажность, %	Гигроскопич. влажн., %	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 (Qiagen, 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 мелколистенных (24,8 %) растений. Среди голосеменных 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 мелколистенных преобладает пыльца кустарниковых растений: ольховник *Alnaster* (13,0 %), березка тощая *Betula exilis* (4,2 %), ива *Salix* (1,4 %). Пыльца деревовидной берески встречается в количестве 6,2 % (*Betula sect. Albae*, *B. platyphylla*). Группа травяно-кустарничковых растений составляет 48,6 %. Абсолютно преобладает пыльца полыни *Artemisia* (41,1 %) – типичного представителя сухих остепненных участков. В целом сравнение ископаемых спектров с современными показывает следующее. Судя по одним образцам, климат в период формирования

ния осадков временами был холодней и, возможно, суще, 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 [Щелкова, 2009]. В нее вошли лесные (мерзлотные палевые) и луговые (мерзлотные черноземовидные, дерново-глеевые и алассные) 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 встречаются как бедные, так и среднеобогащенные и богатые уреазой. В отличие от гидролитических ферментов дегидрогеназа наряду с ферментами фенолоксидазного комплекса участвует в окислительно-восстановительных реакциях биогенеза гумуса и в определенной степени отражает интенсивность процессов гумификации в почвах. Мерзлотные почвы Центральной Якутии бедны или обогащены в средней степени дегидрогеназой. Таким образом, в современных почвах осуществляются основные стадии трансформации органики (распад органических соединений и гумификация), характерные для процесса почвообразования.

Катализная 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 <sub>4</sub> <sup>+</sup> /(г·24 ч)	Фосфатаза, мг ФФ/(г·ч)	Дегидрогеназа, мг ТФФ/(10 г·24 ч)	Катализ, мл O <sub>2</sub> /(г·мин)
<i>Мерзлотная палевая деформированная высоковскользящая</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 <sub>ca</sub>	50–70	0,27	0,01	0	0	0
<i>Мерзлотная палевая осоледелая</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 <sub>1</sub>	22–40	0,29	8,45	0	—	0,81
LD <sub>2</sub>	40–68	0,26	7,66	0	—	1,09
<i>Аласная дерново-луговая</i>						
LD <sub>1</sub>	0–23	1,34	13,45	0,81	—	3,07
LD <sub>2</sub>	23–40	0,09	9,19	0	—	0,79
B <sub>ca</sub>	50–110	0,33	0	0	—	0,33
<i>Аласная оstepненная</i>						
LD <sub>1</sub>	0–19	0,81	2,06	0,88	—	4,95
B <sub>ca</sub>	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 <sub>ca</sub>	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 <sub>g</sub>	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 <sub>ca</sub>	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 среднеобогащенные. 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-

**БИОГЕОХИМИЯ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ**

**Таблица 4. Статистические показатели ферментативной активности мерзлотных почв Центральной Якутии**

Фермент	Горизонт	<i>n</i>	<i>M ± m</i>	Lim	<i>M ± tm</i> ( <i>p</i> = 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
Катализ	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

При мечани е. *n* – количество проб; *M ± m* – среднее арифметическое; Lim – пределы колебаний; *M ± tm* (при вероятности *p* = 0,05) – доверительный интервал.

**Таблица 5. Ферментативная активность отложений 50-метровой террасы**

№ об-разца	Геологич. период	Инвертаза, мг глюкозы/(г·ч)	Уреаза, мг $\text{NH}_4^+$ /(г·24 ч)	Фосфатаза, мг ФФ/(г·ч)	Дегидрогеназа, мг ТФФ/(10 г·24 ч)	Катализ, мл $\text{O}_2$ /(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 – A, B и BC (C): 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 почвах (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 B и BC 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. Катализную активность проявляли пробы верхнеплей-

Таблица 6.

**Корреляционная связь ( $r$ ) ферментативной активности  
с некоторыми физико-химическими свойствами многолетнемерзлых отложений**

Параметр	Инвертаза	Уреаза	Дегидрогеназа	Катализ
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**

Примечание.  $r$ -достоверен с вероятностью: \* $p \leq 0,01$ ; \*\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,02$ .

стоценового возраста и одна из трех проб среднеплейстоценового возраста. В них активность катализы 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 уреаза, дегидрогеназа и катализ. 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 катализы 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 катализы, является мемброносвязанным 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 °C. Она представляет собой сравнительно большую ( $1,0–1,5 \times 3–6$  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/Gene-Bank 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 [Репин 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 mojavensis*, *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-

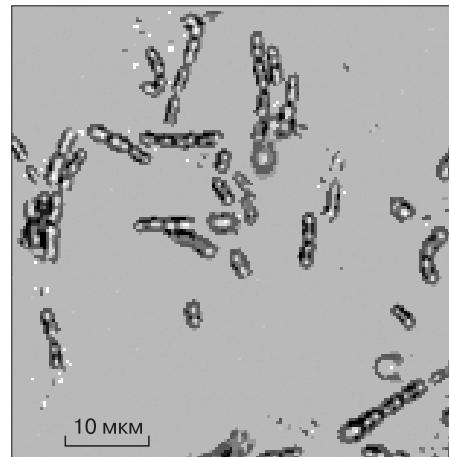


Рис. 1. Выделенный штамм *Bacillus* F (окраска по Граму).

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 инкубированы 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-

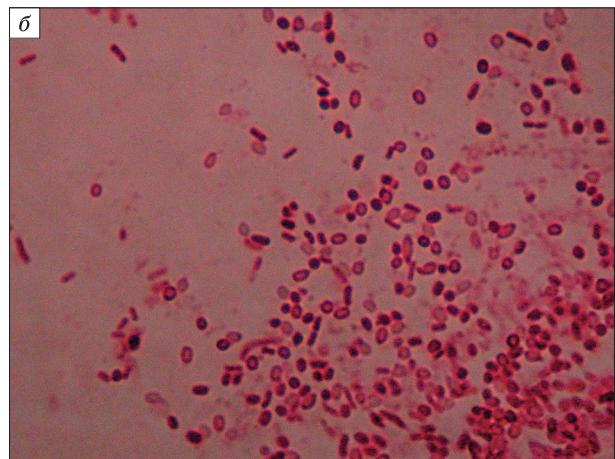


Рис. 2. Морфология клеток бактериальных штаммов 17 (а) и 40 (б), выделенных из мерзлых песчаных отложений неогена Мамонтовой горы (окраска по Граму, увел. 1500).

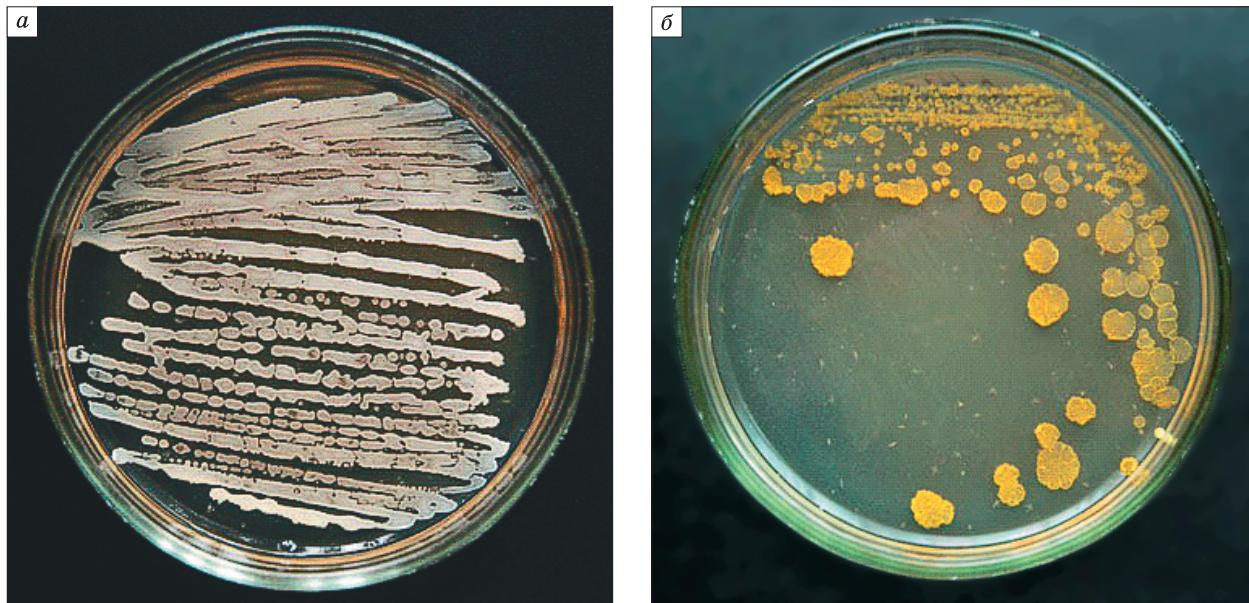


Рис. 3. Колонии бактериальных штаммов 6 (а) и 27 (б), выделенных из мерзлых песчаных отложений неогена Мамонтовой горы.

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 холodu 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 [Репин 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 [Репин 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 (метилирование, дезаминирование, апуринизация, образование тиминовых 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 reparационных 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-

**БИОГЕОХИМИЯ МЕРЗЛЫХ ПОРОД ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ**

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	-	C, Э	C, 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	+	+газ
Гидролиз	казеина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	желатина	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	крахмала	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Образование кислоты из:	глюкозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	маннита	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	арabinозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ксилозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	лактозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	маннозы	-	+	+	+	+сл	+	+	+	-	-	+сл	-	+	+
	сорбита	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рост при условиях:	2 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	43 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	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:	амиака	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> S	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

П р и м е ч а н и е. С – сферическая спора; Э – эллипсовидная 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, уреаза и каталаза, 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 // Геоэкология. 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. Боецков, А.Н. Тихонов, Н. Сузуки. СПб., Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2008, с. 183–190.
- Щелчкова М.В.** Термодинамические показатели активной инвертазы из погребенных почвенных горизонтов поздне-плейстоценового 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.