

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Доманская О.В.^{1,2}, Доманский В.О.², Кулакова А.Ю.²

¹Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, Россия, e-mail: olga-nv@bk.ru

²Тюменский государственный нефтегазовый университет, Тюмень, Россия

Проведен анализ микробиологической и биохимической активности мерзлых отложений Западной Сибири. Общая численность бактерий составила в скважине №1 и №2, соответственно $8,5 \times 10^4$ – $3,8 \times 10^7$ КОЕ/г и $1,12 \times 10^4$ – $1,72 \times 10^8$ КОЕ/г. Распределение численности бактерий в основном зависит от типа грунта и содержания органического вещества. Микроорганизмы, выделенные из исследуемого района, представлены 12 родами. По результатам исследования структуры нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, в двух скважинах доминировали бактерии рода *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Культивирование микроорганизмов при разных температурных режимах позволило отнести большинство штаммов к психротолерантам. Большинство выделанных микроорганизмов способны к росту при содержании в среде 7 % NaCl и три из них при содержании 13 % NaCl. На биохимическую активность мерзлых отложений в основном оказывали влияние температурный фактор и морское происхождение отложений Западной Сибири.

Ключевые слова: мерзлые отложения, микроорганизмы, ферментативная активность.

STUDY MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ACTIVITY OF PERMAFROST OF WESTERN SIBERIA

Domanskaia O.V.^{1,2}, Domanskii V.O.², Kulakova A.Y.²

¹Tyumen Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia, olga-nv@bk.ru

²Tyumen State Oil and Gas University, Tyumen, Russia

The analysis of microbiological and biochemical activity of permafrost of Western Siberia. The number of bacteria colonies picked out from the «Tarko-Sale» samples, was changing within the range of $8,5 \times 10^4$ – $3,8 \times 10^7$ CFU /g (site №1) and $1,12 \times 10^4$ – $1,72 \times 10^8$ CFU /g (site №2). Distribution of bacteria mainly depends on the soil type and organic matter content. Microorganisms isolated from the study area represented by 12 genera. According to the results of investigating the structure of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene, two wells dominant bacteria of the genus *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. Cultivation of microorganisms under different temperature conditions, allowed to carry the majority of the strains to psychrotolerant. Most wrought microorganisms capable of growing in a medium with the content of 7 % NaCl, and three of them if they contain 13 % NaCl. On the biochemical activity of frozen deposits mainly influences the temperature factor and marine origin of deposits of Western Siberia.

Keywords: permafrost, microorganisms, enzymatic activity.

Вечная мерзлота занимает около 26 % поверхности Земли и 65 % территории России, и представляет собой уникальную экологическую нишу с варьирующими в широком диапазоне физико-химическими показателями (температура, pH, концентрация минеральных солей и др.), что определяет многообразие экофизиологических групп микроорганизмов. За последние три десятка лет были проведены обширные исследования видового состава и численности микроорганизмов в объектах криосферы [8,13,14].

Биологическое разнообразие рассматривается как необходимое условие для нормального функционирования экосистем и биосферы. В ряде стран именно характеристика биологического разнообразия выступает в качестве основы экологической политики государства, стремящегося сохранить свои биологические ресурсы, чтобы

обеспечить устойчивое экономическое развитие. Биоразнообразие является фундаментальным понятием, определяющим уровень организации жизни на Земле и адаптацию биосистем определенного эволюционного уровня к разным условиям среды.

Вместе с тем проблемы изучения биологических свойств бактерий и их особенностей, как формирования состава, так и экологических ниш микробных сообществ в многолетнемерзлых толщах, особенно в части структурно-функциональной организации и динамики микробиоценозов, далеки от своего разрешения.

Цель исследования: изучение микробиологической и биогеохимической активности и ее влияние на криобиологический ресурсный потенциал верхних горизонтов криолитозоны Западной Сибири.

Объекты и методы исследования

Для микробиологических и биохимических исследований использовали образцы мерзлых отложений, отобранные сотрудниками ТюмГНГУ НИИ криогенных ресурсов-ТюмНЦ СО РАН в 2005 г. из керна скважин, пробуренных в районе Тарко-Сале. Согласно схеме мерзлотного районирования Западная Сибирь характеризуется прерывистым и островным распространением многолетнемерзлых пород [3]. Черты рельефа сформировались в среднем, позднем плейстоцене и голоцене под влиянием морских трансгрессий и аккумулятивной деятельности рек и озер, а также мерзлотных процессов. Вскрытые скважинами отложения предположительно зырянского возраста (Q^{2-3}_{1-al}) [12].

Образцы хранились до начала исследования в холодильной камере при температуре -18°C.

Биохимические анализы проводили в образцах сразу после оттаивания. Активность каталазы определяли методом Р.С. Кацнельсона и В.В. Ершова (1958), дегидрогеназы методом К.А. Козлова и Н.А. Михайловой (1965), инвертазы и уреазы определяли методом Т.А.Щербаковой (1983), амилазы методом А.Ш. Галстяна (1978), протеазы методом Ф.Х. Хазиева и Я.М. Агафаровой (1975) [11].

Из полученного мерзлого керна ненарушенного сложения для микробиологических исследований отбирали центральную часть в асептических условиях.

Учет численности и выделение микроорганизмов осуществляли методом серийных разведений на твердых питательных средах следующего состава: мясо-пептонный агар для различных хемоорганогетеротрофных бактерий; картофельно-глюкозный агар для актиномицетов и бактерий; среда Чапека для грибов [10], культивировали при температуре +5°, +16° и +36°C. Культуральные свойства и физиолого-биохимические признаки изучали с использованием стандартных методик. Морфологический анализ бактериальных клеток осуществляли с помощью светового микроскопа ЛОМО МИКМЕД-5 при увеличении

100×10, фотографирование осуществляли с помощью цифровой камеры DigitalCameraforMicroscopeDCM 150. Идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью определителя Берджи [2].

Секвенирование осуществляли в научно-производственной компании СИНТОЛ (г. Москва). Полученные в результате нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями из международного банка данных NCBI с помощью пакета программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК использовали программу ClustalW2. Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA версия 5.2.

Результаты и обсуждения

Исследовано 13 образцов многолетнемерзлых отложений Западной Сибири, Пуровского района (близ населенного пункта Тарко-Сале), отобранных из двух скважин с глубин 1,5 – 30,3 м. Скважина № 1 расположена на поверхности гряды с кустарничково-моховой растительностью. В разрезе до 1 м залегает торф, до глубины 20 м – супесь с прослоями песка, суглинка и глины, перекрывающая суглинок с прослоями супеси и глины. Скважина № 2 находится в сосновом редколесье, с поверхности до 2,5 м залегает торф, до 16 м пески с прослоями суглинка, супеси и глины, перекрывающие супесь с прослоями суглинка.

Для пород одного генезиса, близких по составу и возрасту, общая численность бактерий составила в скважине № 1 и № 2, соответственно $8,5 \times 10^4 - 3,8 \times 10^7$ КОЕ/г и $1,12 \times 10^4 - 1,72 \times 10^8$ КОЕ/г

Исследования включали изучение физико-химических свойств мерзлых пород, определяющие особенности формирования микробиоты в условиях Западной Сибири (табл.1).

Так, в скважине № 1 численность бактерий возрастает с увеличением дисперсности отложений. Наиболее заселенным оказался образец вблизи литологической границы оторфованного суглинка и пластичномерзлых глин (20 м), где, вероятно, существуют наиболее оптимальные температурные и влажностные условия.

В скважине № 2 максимальное содержание органики и влаги сосредоточено в верхних горизонтах, в связи с этим количество микроорганизмов на глубине 1,5 м и 2,5 м наибольшее, на глубине 4,2 м численность бактерий понижена, что обусловлено сменой состава отложений – переходом от оторфованных суглинков к среднезернистым пескам.

Микробные клетки могут быть сконцентрированы в слое годовых теплооборотов, это связано с изменением толщины пленочной воды, вызванные колебанием температуры [15].

Рост численности бактерий отмечен вблизи слоя сезонного протаивания в среднеразложившемся торфе (1.5 м, скв.2) и оторфованных суглинках (2.5 м, скв.1), а также в пластичномерзлых глинистых отложениях (20.0 м, скв.1).

Распределение микроорганизмов по разрезу в скважине определяется не столько температурными условиями, сколько типом грунта и наличием органических веществ. Так, численности микроорганизмов больше в глинистых породах, по сравнению с песчаными ($r=0,8$). По-видимому, это связано с тем, что органическое вещество лучше закрепляется на поверхности глинистых частиц и влияет на увеличение численности микроорганизмов.

Таблица 1

Некоторые физико-химические показатели и общая численность микроорганизмов образцов мерзлых отложений Западной Сибири

№ скважины	Глубина, м	Тип грунта	Температура, °С	Влажность, w%	pH	C _{орг}	КОЕ/г
1	2,5	супесь	-0,25	28,80	5,70	15,25	8,5*10 ⁴
	10,1	суглинок	-0,9	46,26	7,55	2,78	1,8*10 ⁵
	10,5	суглинок	-1,89	45,49	7,85	2,49	2,6*10 ⁶
	20	супесь	-1,49	76,49	7,02	5,85	3,8*10 ⁷
	30,3	суглинок	-1,26	-	7,59	7,39	1,25*10 ⁷
2	1,5	торф	0,25	80,61	-	15,25	1,53*10 ⁷
	2,5	глина	-0,23	39,4	5,00	7,63	1,72*10 ⁸
	4,2	суглинок	-0,30	40,5	5,60	7,95	1,12*10 ⁴
	10,1	супесь	-0,30	42,45	-	-	2,1*10 ⁵
	10,5	супесь	-0,35	-	-	-	2,3*10 ⁵
	12,3	песок	-0,38	43,07	6,30	-	2,0*10 ⁶
	20	супесь	-0,30	30,32	7,54	2,08	9,1*10 ⁶
	30,2	супесь	-0,11	19,05	7,66	1,89	2,71*10 ⁶

С целью выявить различные физиологические группы по отношению к температуре роста, микроорганизмы культивировали при разных температурных условиях. Рост бактерий наблюдался при температуре +16° и +36°С, а при +5°С отсутствовал. Учет численности бактерий, выделенных при температуре культивирования +36°С, на 1–2 порядка меньше, чем при +16°С.

Результаты численности бактерий в образцах двух скважин при различных температурах указывает на психротолерантный характер микробного сообщества. Это соответствует ранее опубликованным данным, свидетельствующим, что большинство микроорганизмов, выделяемых из мерзлых осадочных пород, являются психротолерантными.

По результатам микробиологических исследований в чистую культуру было выделено 63 штамма бактерий, составивших рабочую коллекцию, из них у 44 штаммов была исследована структура нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. В скважине № 1 в основном преобладали представители рода *Bacillus*, *Enterobacter* и *Stenotrophomonas*, в

скважине № 2 – *Bacillus*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Большинство выделенных микроорганизмов имеют способность к спорообразованию, по-видимому, это связано с воздействием неблагоприятных природных факторов. Известно, что споры обладают высокой устойчивостью к низким температурам, повышенной засоленности и др. экстремальным факторам среды, а также способностью к реактивации после длительного анабиоза [1].

Способность к росту в условиях осмотического стресса была изучена при концентрациях NaCl от 1 – 13 % при температуре культивирования +10 °С (температура оптимальная для роста психротолерантных бактерий). В ходе эксперимента также была выявлена способность к росту при 7 % NaCl у большинства исследованных микроорганизмов и у трех бактериальных штаммов способность к росту при содержании в среде 13 % NaCl, и в том и другом случаях оказались из рода *Bacillus* и *Acinetobacter*.

Гидролитическую активность мерзлых отложений оценивали по разложению сахарозы (инвертазы), мальтозы (амилазы), расщепление амидов (уреазы) и белков до пептидов (протеазы) (табл. 2).

Анализ инвертазной активности мерзлых отложений выявил высокие значения в двух скважинах. В целом активность инвертазы в скважине № 1 варьировала в пределах от 64,7 до 265,9 мг глюкозы на 1 г грунта за 24 ч, в скважине № 2 от 51,0 до 292,07 мг глюкозы на 1 г грунта за 24 ч (далее ед.), что сопоставимо с активностью современных мерзлотных почв [7]. Частота обнаружения активного фермента в образцах не зависела от глубины отбора исследуемых проб. Активность инвертазы согласно градациям обогащенности почв ферментами [6] оценивается как очень богатая. Корреляционный анализ показателей активности инвертазы в мерзлых отложениях и их физико-химических свойств не выявил достоверных зависимостей.

Активность амилазы в образцах мерзлых отложений была очень низкой и варьировала в пределах 0 до 0,012 ед. По-видимому, с длительностью воздействия низких температур амилитическая активность снижается.

Уреазная активность была обнаружена только в 5 исследуемых образцах. Следует отметить низкий уровень активности этого фермента, возможно, это связано с инактивацией под воздействием низких температур.

Пределы средних значений активности протеазы в скважинах варьирует от 0,34 до 0,48 ед., что по шкале Звягинцева, оценивается как бедные. Корреляционный анализ выявил достоверную обратную связь между активностью протеазы и глубиной залегания пород ($r = -0,75$).

Окислительно-восстановительные процессы мерзлых отложений оценивали по активности каталазы и дегидрогеназы.

Каталазная активность исследуемых образцов значительно варьировала. Наиболее высокая была отмечена в скважине № 1 на глубине 30 м и 20 м., в скважине № 2 в интервале 2,5 м – 4,2 м. Если провести оценку по шкале Звягинцева (1978), то исследуемые пробы можно охарактеризовать как бедные и очень бедные. Каталазная активность – один из характерных показателей биологической активности. Активность каталазы зависит от содержания органического вещества и количества микробиоты. Анализ корреляционных связей активности фермента с физико-химическими свойствами образцов не выявил четких связей. Однако отмечена достоверная положительная корреляционная связь с численностью жизнеспособных бактерий в исследуемых пробах.

Дегидрогеназная активность в образцах практически отсутствует и находится в диапазоне от 0 до 0,01 мг ТФФ/1 г за 24 часа. Возможно, это связано с морским происхождением отложений и неблагоприятным влиянием высоких концентраций натрия на активность фермента [9].

Таблица 2

Ферментативная активность в образцах мерзлых отложений Западной Сибири

№ скважины	Глубина, м	Инвертаза (мг глюкозы /г за 24 ч)	Амилаза (мг мальтозы/г за 24 ч)	Уреаза (N-NH ₄ /г*4ч)	Протеаза (мг глицин/ гза 24 ч)	Каталаза (мл O ₂ (г*20 мин)	Дегидрогеназа (ТФФ мг/г за 24 ч)
1	2,5	81,86	0,004	0,022	0,480	1,606	0,002
	10,1	269,25	0,003	0,000	0,467	0,303	0,001
	10,5	64,17	0,005	0,020	0,347	0,775	0,002
	20	67,47	0,003	0,022	0,374	2,347	0,001
	30,3	89,30	0,000	0,000	0,341	3,021	0,000
2	1,5	292,07	0,012	0,000	0,402	0,056	0,005
	2,5	66,37	0,000	0,000	0,448	1,617	0,000
	4,2	77,96	0,001	0,000	0,439	1,651	0,000
	10,1	90,04	0,004	0,055	0,460	0,112	0,002
	10,5	98,82	0,002	0,000	0,427	0,112	0,001
	12,3	129,20	0,005	0,000	0,422	0,213	0,002
	20	83,57	0,012	0,000	0,404	0,112	0,005
30,2	51,00	0,003	0,030	0,371	0,000	0,001	

Таким образом, в образцах мерзлых отложений обнаружены ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных и гидролитических процессах. Высокие показатели инвертазой активности свидетельствуют о биохимической активности среды и термостабильности фермента в низкотемпературных условиях среды. Активность амилазы, уреазы и протеазы зависит от длительности воздействия низких температур.

Обнаружена прямая связь между активностью каталазы и численностью жизнеспособной микрофлоры. Особое влияние на ферментативную активность оказывает морское происхождение отложений – характерна низкая ферментативная активность при высокой численности микроорганизмов. В целом результаты по биохимической активности подтверждают ранее полученные данные о сохранении в мерзлых отложениях ферментной активности инвертаз, протеаз, каталаз и др.

Заключение

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о наличии региональных особенностей формирования сообществ микроорганизмов. Для рассматриваемого района Западной Сибири эти особенности заключаются в возможности длительного сохранения жизнеспособных микроорганизмов, а также в способности расти при высоких концентрациях хлорида натрия в среде, что возможно связано с морским происхождением отложений и адаптацией микроорганизмов к условиям засоленности отложений во время трансгрессий и криогенной консервацией. Низкая ферментативная активность, при относительно высокой численности микроорганизмов, также является особенностью изученных мерзлых отложений с морским происхождением осадков.

Список литературы

1. Абызов С.С., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б. Микробиологическое исследование ледника в Центральной Антарктиде // Известия АН СССР. Сер. биол. – 1979. – № 6. – С. 828–836.
2. Берджи Определитель бактерий / пер. с англ. [под ред. Дж. Хоулта и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2.
3. Геокриология СССР. Западная Сибирь [Под ред. Э. Д. Ершова.]. – М.: Недра, 1989. – 454 с.
4. Губин С.В., Максимович С.В., Занина О.Г. Анализ состава семян растений из ископаемых нор сусликов лессово-ледовых отложений обнажения Зеленый Мыс, как показатель местных условий обитания // Криосфера Земли. – 2001. – Т.V. – №20. – С.76–82.
5. Егорова Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М.: ИЦ «Академия», 2005. – 608 с.
6. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых её показателей // Почвоведение. – 1978. – №6. – С. 48-54.
7. Макарова А.П., Напрасникова Е.В. Микробиологическая и биохимическая характеристика мерзлотных почв Северного Забайкалья // Известия Иркутского государственного университета сер. Биол. – 2011. – Т.4. – №1. – С. 25- 32.

8. Мельников В.П., Рогов В.В., Курчатова А.Н., Брушков А.В., Грива Г.И. Распределение микроорганизмов в мерзлых грунтах //Криосфера Земли. – 2011. – Т.XV. – № 4. – С.86 – 90.
9. Миньковская Н.Е. Ферментативная активность мерзлых осадочных пород: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.,1995. – 25 с.
10. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов / А. И. Нетрусов, М. А., М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под.ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
11. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии /Ф.Х. Хазиев. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
12. Черкасова Е.Н. Казбакова Х.Т., Пахомова А.С. и др. Комплексные исследования инженерно-геологических свойств грунтов района Тарко-Сале // Материалы международной конференции: Криогенные ресурсы полярных и горных регионов. Состояние и перспективы инженерного мерзлотоведения. – 2008. – С 422–425.
13. Margesin R., Schinner F, Jean,-Claude Marx, Charles Gerday. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology// Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008. Vol. 462.
14. Rivkina E., Gilichinsky D., Laurinavichius K., Shcherbakova V., McGrath J., Tiedje J. Microbial life in permafrost // Advances in Space Research (includes Cospas Information Bulletin). 2004. T. 33. № 8. P. 1215-1221.
15. Spirina, E. &Fedorov-Davydov, D. Microbiological characterization of cryogenic soils in the Kolymskaya Lowland. Eurasian Soil Sci. 1998. № 31. P. 1331–1344.

Рецензенты:

Мельников В.П., д.г.-м.н., председатель ТюмНЦ СО РАН, г. Тюмень;

Боме Н.А., д.с.-х.н., профессор, заведующая кафедрой ботаники, биотехнологии и ландшафтной архитектуры, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет» Минобрнауки России, г. Тюмень.