

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 551.341

Г.М. Едидин¹, А.В. Брушков², С.Г. Игнатов³

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ МЕРЗЛЫХ ГРУНТОВ

Из многолетнемерзлых пород Мамонтовой горы в Республике Саха (Якутия) получены образцы для проведения микробиологического анализа. Выделены грамположительные бактерии рода *Bacillus*. Выделена ДНК и выполнено секвенирование из выделенных бактерий. Проведен филогенетический анализ микроорганизмов из мерзлых грунтов.

Ключевые слова: мерзлые грунты, Мамонтова гора, бактерии, секвенирование, филогенетический анализ.

From the permafrost of Mammoth Mountain in the Republic of Saha (Yakutia) samples were obtained for subsequent microbiological analysis. We were isolated Gram-positive bacterium *Bacillus* genus. Conducted DNA isolation and sequencing of the isolated bacteria. Phylogenetic analysis of the microorganisms from the permafrost.

Key words: Permafrost, Mammoth Mountain, bacteria, sequencing, phylogenetic analysis.

Введение. Многолетнемерзлые породы широко распространены на Земле, а их возраст в некоторых регионах может достигать нескольких миллионов лет. Низкие значения температуры и переход воды (универсального биологического растворителя, необходимого для существования жизни) в лед замедляют и останавливают биологические процессы, что способствует переходу микроорганизмов в анабиотическое состояние. Таким образом, мерзлые грунты могут быть своеобразным криохранилищем биологического разнообразия планеты. Известно, что микроорганизмы после низкотемпературного замораживания не только сохраняют жизнеспособность, но и существенно не меняются активность многих ферментативных систем бактерий [Игнатов и др., 1981]. Сравнительно недавно из мерзлых дисперсных пород выделены живые микроорганизмы [Мельников и др. 2011].

Выживание бактерий после пребывания при низкой температуре — сложный биологический процесс, связанный с восстановлением повреждений — репарацией [Игнатов и др., 1982]. Успешность репарации и последующего выживания зависит от многих процессов, в том числе от уникальных свойств того или иного организма. Интерес к изучению микроорганизмов, выживших после экстремальных воздействий, обусловлен не только необходимостью изучать механизмы устойчивости и восстановления, но и возможно-

стью применять полученные знания для защиты человеческого организма от вредных воздействий. Предварительные данные показали, что микроорганизмы, выделенные из мерзлых грунтов, обладают протективным действием для мышей, предохраняя их от патогенных бактерий [Fursova et al., 2012]. Генетический аппарат бактерий — основной регулятор всех биологических процессов, поэтому его необходимо изучать и анализировать.

Цель работы — характеристика мерзлотных условий района, определение биологических свойств, выделение ДНК, секвенирование, сборка геномов жизнеспособных культивируемых микроорганизмов в мерзлых толщах Мамонтовой горы (Якутия), микробиологические исследования которых ранее не выполнялись.

Краткое описание объекта исследований. Объект изучения находится в республике Саха (Якутия) и представляет собой один из наиболее интересных и полных разрезов неоген-плейстоценового осадконакопления Восточной Сибири. Район Мамонтовой горы находится на левобережном участке долины, примыкающем непосредственно к руслу р. Алдан. Древнейшие рыхлые образования, вскрытые в районе исследования, представлены песчаными однообразно построенными отложениями, залегающими в основании 60- и 80-метрового обнажения. Подстилают их отложения 50-метровой террасы, сложенные песками

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет, кафедра геокриологии, аспирант; *e-mail:* edidin.grigory@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет, кафедра геокриологии, заведующий кафедрой, профессор, докт. геол.-минерал. н.; *e-mail:* brouchkov@geol.msu.ru

³ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ, заведующий лабораторией, докт. биол. н.; *e-mail:* ignatov@obolensk.org

среднемиоценовой мамонтовогорской свиты, в разных частях обнажения имеют мощность от 10 до 40 м. На них с размывом залегают плейстоценовые отложения. Последние подразделяются на три разновозрастные толщи, отличающиеся условиями формирования, составом и криогенным строением [Соловьев, 1979].

Методика отбора образцов, исследования их свойств и выделения микроорганизмов. Для исследования отобраны образцы песка из района обнажения Мамонтова гора. В полевых условиях из мерзлых толщ с помощью стерилизованных спиртом и обожженных в пламени инструментов отобраны образцы мерзлых пород ненарушенной структуры массой от 4 до 6 кг, преимущественно песчаного состава, с редкими прослоями мелкодисперсных грунтов и включениями органических остатков. Пробы мерзлых пород на микробиологические исследования взяты в зонах максимальной интенсивности речной эрозии из свежеобрушенных вертикальных стенок обнажения в его средней и нижней частях в интервалах от 5 до 10 м выше уреза реки и от 20 до 30 м ниже уровня земной поверхности. Скорость термоэрозионного разрушения обнажения в местах отбора, по данным выполняемых режимных наблюдений, превышает 4 м в год в верхней части и достигает 1,5 м в средней. Отбор проводился с глубины, превышающей мощность сезонноталого слоя на 1–1,5 м, что исключало попадание в зону отбора пород, оттаявших ранее. Отобранные монолиты хранились в мерзлом состоянии при температуре, близкой к естественной (–5 °С). Транспортировка проб в лабораторию также осуществлялась без их оттаивания — в термоконтейнерах с хладагентами.

В лабораторных стерильных условиях из центра образца извлекали пробу размером 3×4 см, помещали в спирт на 2–3 с, после чего обжигали в пламени спиртовки. Обработанный таким образом материал переносили в пустую стерильную чашку Петри и оставляли для дальнейшего оттаивания при комнатной температуре (20 °С) в течение часа.

В образцах из древних отложений Мамонтовой горы обнаружена культивируемая бактерия, способная к аэробному и анаэробному росту. Микроорганизм является психротолерантным, так как способен к метаболической активности при –5 °С. Бактерии представляли собой сравнительно большие (от 3 до 6 мкм) палочки, которые формировали цепи при культивировании и были способны образовывать споры круглой формы. Эти грамположительные бактерии были неподвижны и обладали гемолитической активностью. Полученные микроорганизмы принадлежат роду *Bacillus*.

Из образцов выделено 5 штаммов бацилл образцы (g 13, g 17, g 20, g 27, g 40). После этого

проводили секвенирование, сборку генома и построение филогенетических деревьев.

Наибольшее видовое подобие выделенной бациллы отмечено с *Bacillus cereus* (g 20, g 27 и g 40) и *B. pumilus* (g 13, g 17).

Можно предположить, что бактерии, сохранившие жизнеспособность в многолетнемерзлых породах, находятся там в покоящихся формах, а для перехода в вегетативное состояние им требуется около 3 сут. пребывания при положительной температуре [Мельников и др., 2011].

Методика секвенирования и сборки геномов. Особенности геномов. В результате выделены штаммы g 13, g 17, g 20, g 27, g 40 разного вида с разным размером генома. Длина генома составляла от 3 627 905 (образец g 17) до 5 531 460 (образец g 27) пар нуклеотидов (таблица). Затем происходила процедура сборки генома.

Таблица 1

Длина генома после секвенирования

Номер образца	Длина, б.п.	Определение вида бактерии, по GenBank
g 13	3 628 037	<i>Bacillus pumilus</i>
g 17	3 627 905	<i>Bacillus pumilus</i>
g 20	5 379 620	<i>Bacillus cereus</i>
g 27	5 531 460	<i>Bacillus cereus</i>
g 40	5 398 680	<i>Bacillus cereus</i>

По филогенетическим деревьям оценен предполагаемый возраст исследуемых образцов g 20–40 и g 27. Он составил приблизительно 70 000 лет. Этот возраст подсчитан для стандартной скорости возникновения мутаций. Она предположительно одинакова как для бактерий в мерзлых породах, так и для свободноживущих. Но это утверждение небесспорно, вероятно, что такая скорость может уменьшаться в десятки и даже сотни раз. Кроме того, для спорообразующих бактерий, какими являются выделенные микроорганизмы, время их существования в виде спор пока изучено недостаточно, поэтому число мутаций может сократиться и из-за длительного нахождения споры в окружающей среде. В нашем случае скорость мутаций, вероятно, на порядок меньше, поэтому возраст микроорганизмов может достигать нескольких миллионов лет.

В заключение построены филогенетические деревья, показывающие степень родства исследованных нами образцов между собой и с выбранными (родственными) образцами из ГенБака (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (рис. 1, 2). Деревья строятся по отрезку 16SPHK, так как он наиболее консервативный.

Филогенетическое дерево образцов g 20–40 и g 27 (рис. 2) показывает, что эти образцы, по всей видимости, являются древними (так как длина

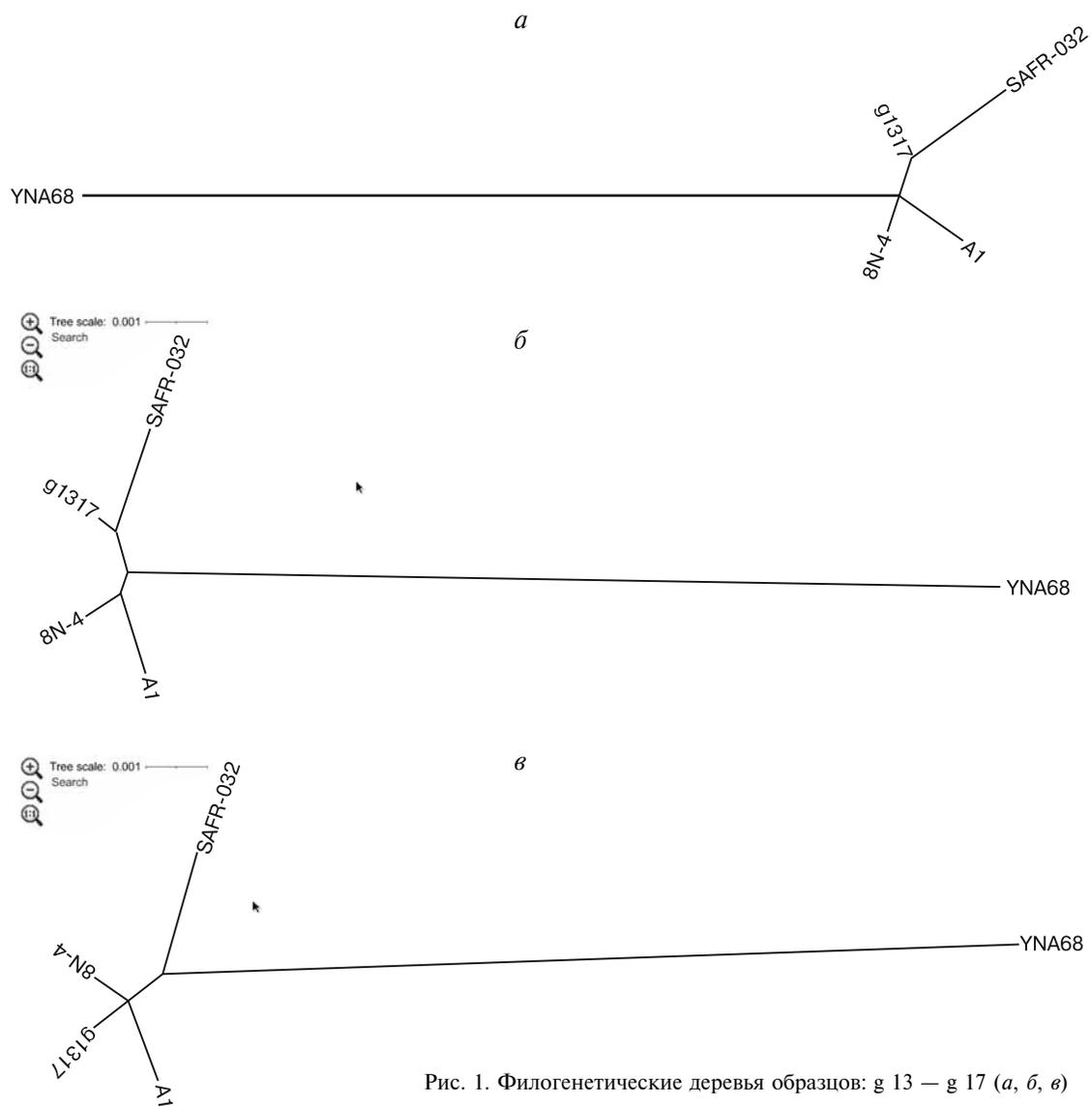
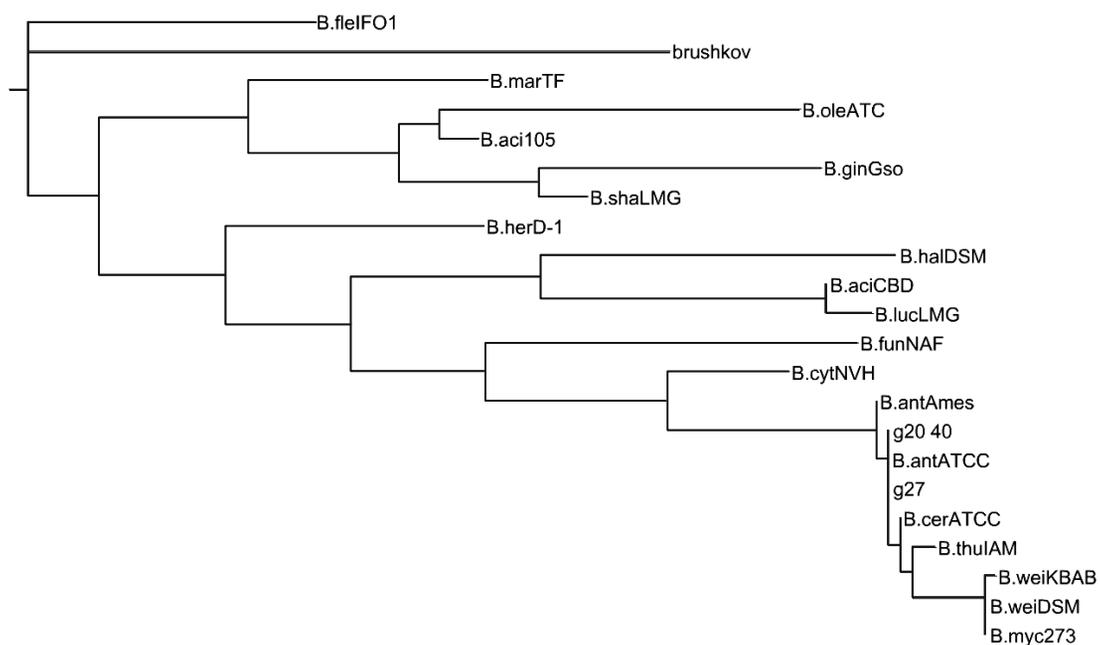
Рис. 1. Филогенетические деревья образцов: г 13 — г 17 (*a*, *б*, *в*)

Рис. 2. Филогенетическое дерево для образцов г 20–40 и г 27

ветки, по сути, – количество эволюционных изменений).

Выявленные биологические свойства бактерий наряду с самим фактом сохранения ими жизнеспособности на протяжении значительного промежутка времени позволяют говорить о необходимости более детального их изучения и перспективности использования выделенных штаммов в биотехнологиях.

Выводы: 1. Мерзлые породы обнажения Мамонтова гора содержат жизнеспособные микроорганизмы, находящиеся в мерзлой толще с момента промерзания отложений.

2. У исследуемых бактерий водородный показатель рН изменяется от 4,5 до 9,5 в различных средах, температура от 30 до 110 °С. Эти показатели не соответствуют предполагаемым условиям осадконакопления в районе р. Алдан, а тем более не соответствуют условиям существования

мерзлых пород в регионе. Таким образом, можно предположить, что бактерии, сохранившие жизнеспособность в многолетнемерзлых породах, находятся там в покоящихся формах, а для перехода в вегетативное состояние им требуется около 3 сут. пребывания при положительной температуре.

3. Секвенирование ДНК и анализ генома позволили идентифицировать исследуемые микроорганизмы. Микроорганизмы принадлежат роду *Bacillus*. Наибольшее видовое подобие выделенных бацилл отмечено с *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus*. Филогенетические деревья образцов показывают, что эти образцы, вероятно, древние. Возраст образцов предположительно, на основе допущения постоянной скорости мутаций, составил 70 000 лет. Оценка возраста микроорганизмов требует дополнительных исследований, так как скорость мутаций может уменьшаться в десятки и даже сотни раз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Игнатов С.Г., Андреева О.В., Евдокимова О.А. и др. Изучение репарации мембранных повреждений, вызванных низкотемпературным замораживанием клеток *E. coli* // Биохимия. 1982. Т. 47, № 10. С. 1621–1628.

Игнатов С.Г., Красильников В.А., Перелыгин В.В. и др. Изучение функциональных и структурных изменений мембран *E. coli* после низкотемпературного замораживания // Биохимия. 1981. Т. 46, № 11. С. 1996–2003.

Мельников В.П., Рогов В.В., Брушков А.В. и др. Распределение микроорганизмов в мерзлых грунтах // Криосфера Земли. 2011. Т. 5, № 4. С. 86–90.

Неогеновые и плейстоценовые отложения Центральной Якутии / Под ред. П.А. Соловьева. Якутск: Якутский филиал СО АН СССР, 1979. 37 с.

Nacional Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.genbank.com> (дата обращения: 17.03.2015).

Fursova O., Brouchkov A., Potapov V. et al. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against salmonella infection in mice // Probiot. Antimicrob. Proteins. 2012. Vol. 4. P. 145–153.

Поступила в редакцию
03.03.2016