

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РЕАКТИВАЦИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО АНАБИОЗА В ТОЛЩЕ АНТАРКТИЧЕСКОГО ЛЕДНИКА

С.С. Абызов, И.Н. Мицкевич, М.Н. Поглазова

Ранее опубликованные работы по исследованию микрофлоры различных горизонтов ледника Антарктиды были посвящены, главным образом, выявлению микроорганизмов, определению их численности, изучению их морфологического разнообразия и жизнеспособности [1–5]. Из слоев ледника глубиной до 1500 м (что соответствует возрасту свыше 400 тыс. лет) были получены и культуры микроорганизмов, относящиеся к различным таксономическим группам [6].

О присутствии жизнеспособных клеток в более глубоких горизонтах свидетельствовали результаты экспериментов с использованием радиоизотопных методов [2], а также прямые наблюдения за увеличением численности клеток микроорганизмов в пробах талого льда после выдерживания их при положительной температуре.

Представлялось интересным провести сравнительный анализ активности размножения бактериальных клеток в различных температурных условиях после их выхода из состояния анабиоза. Кроме того, обнаружение мезофильных и психрофильных типов бактерий в разных горизонтах ледниковой толщи, в том числе и в древнейших, возраст которых достигает 500 тыс. лет и более, поможет в какой-то мере охарактеризовать микрофлору, занесенную на поверхность ледяного щита Антарктиды в разные геологические периоды, что позволит косвенно судить о климатических условиях, существовавших в те времена.

При постановке экспериментов и анализе их результатов мы исходили, прежде всего, из оценки основных факторов среды, под влиянием которых находились микроорганизмы с момента попадания их в условия низких температур и которые являлись определяющими для сохранения их жизнеспособности.

Поднятые ветровыми потоками в атмосферное пространство и попавшие затем в зону холодного воздуха над ледяным щитом Антарктиды, живые клетки микроорганизмов подвергаются обезвоживанию в результате высушивания и замораживания, поскольку температура воздуха над поверхностью ледникового купола достигает 70–75° ниже нуля [7]. В этот период часть живых клеток микроорганизмов переходит в покоящееся состояние, часть погибает. Из литературных данных следует, что вследствие дегидратации

количество жизнеспособных клеток снижается до 50–70% даже при сравнительно коротких сроках консервации [8, 9]. Известно, что на сохранение жизнеспособности микробных клеток оказывают влияние различные условия, как предшествующие их переходу в состояние анабиоза, так и сопровождающие этот процесс. При этом имеют значение индивидуальные особенности микроорганизмов, стадия развития и физиологическое состояние клеток, а также условия проведения обезвоживания (температура, скорость процесса обезвоживания, аэрация, наличие протекторов и др.) [10–15].

Как следует из данных, полученных гляциологами, с возрастанием глубины горизонтов ледника происходит постепенное увеличение температуры: от $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ на поверхности до $-2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в его основании [16]. Микроорганизмы, попадающие на ледяной щит Антарктиды и погружающиеся в его толщу, также испытывают постоянную смену температур. При этом бактерии, которые находятся в основании ледника, в наиболее древних слоях, имеющих возраст 500 тыс. лет и более, проходят фактически весь температурный спектр консервации.

С изменением глубины, возраста и температуры в ледниковых пластах меняются и другие показатели, такие как давление, структура льда и другие его физические и гляциологические характеристики [17], в результате чего исследуемые нами объекты, отобранные с разных глубин, находятся в неоднозначных стартовых условиях. Кроме того, их микробиологический состав может быть неодинаков.

Материалы и методы исследования

Отрезки ледяного керна с горизонтов от 708 до 3049 м, хранившиеся в холодильных установках Санкт-Петербургского Института Арктики и Антарктики, периодически использовали для проведения экспериментов. Каждый из отрезков соответствовал определенной глубине ледниковой толщи Антарктиды. Из этих отрезков асептически получали пробы талой воды по методу С.С. Абызова [18]. Метод предусматривает вытаивание льда из центральной части отрезка керна при контакте его нижней поверхности с плоскостью нагревателя, имеющего форму слегка вогнутого конуса. В этой части установки температура образующейся талой воды соответствует $6\text{--}13\text{ }^{\circ}\text{C}$ в зависимости от исходной температуры образцов льда. При выходе из воронки-нагревателя в водосборную трубку талая вода продолжает медленно нагреваться до $18\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$, что связано с устройством установки. Вся процедура занимает 20–30 мин.

Объем пробы из каждого отрезка не превышал в среднем 300–500 мл. Большую

часть объема каждой пробы (100–150 мл) расходовали на определение исходной численности бактерий. Оставшуюся часть разливали по 20–30 мл в стерильные флаконы и использовали для инкубации в различных условиях.

Численность бактерий определяли методом прямого счета в люминесцентном микроскопе ЛЮАМ-И2 после их осаждения на мембранные фильтры и окрашивания флуорескаминол по методу, предложенному Поглазовой и Мицкевич [19].

Пробы полученной талой воды инкубировали с добавлением и без добавления органического субстрата при разных температурных режимах (от 10 до 30 °С). Длительность экспериментов колебалась от трех до десяти суток. Безусловно, наиболее показательными могут быть сравнительные данные, полученные с одного горизонта. Однако в связи с недостаточным объемом проб эти первоначальные эксперименты пришлось проводить на пробах, полученных с разных горизонтов.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов пробы инкубировали при температуре 10 и 20 °С с добавлением и без добавления гидролизата казеина. Внесение в талую воду органического субстрата в концентрации 0,01% при указанных температурах в большинстве случаев вызывало лишь небольшое увеличение численности бактерий. В пробе с горизонта 746 м размножение клеток было более активным, вероятно в связи с более высоким содержанием органики, при котором добавление гидролизата казеина в низких концентрациях вообще не оказало никакого влияния (рис. 1, см. Приложение).

Слабая реакция на внесение в пробы гидролизата казеина указывает на то, что в пробах может содержаться некоторое количество органического вещества, достаточное для размножения клеток по крайней мере в течение первых нескольких суток.

По имеющимся в литературе данным, в ледниковой толще содержится некоторое количество органического вещества. Так, в пробе с глубины 3590 м, соответствующей зоне аккреционного льда, концентрация Сорг измеряется величиной 0,5 мг/л [20].

Наличие органического субстрата, представленного в виде лизированных клеток бактерий и микроводорослей, а также растительных остатков, подтверждено нами при микроскопировании поверхности фильтров, на которые осаждены пробы [5].

Из проведенных экспериментов следует, что небольшого содержания органического вещества в талой воде достаточно для реактивации и размножения бактерий в начальные сроки инкубации после длительного пребывания в состоянии

анабиоза. Это согласуется с результатами исследований, которые показали, что бедные среды, в частности дистиллированная вода, по сравнению с богатыми средами способствуют лучшему сохранению жизнеспособности замороженных клеток как в процессе реактивации, так и в первые сроки размножения [21].

Анализ результатов, представленных на рис. 1, показывает, что на увеличение численности микробных клеток оказывает влияние температура. Так, при 20 °С бактерии размножаются более активно, чем при 10 °С.

Далее, при инкубации проб, извлеченных с глубин 952–2974 м, при температуре 15, 20 и 25 °С оказалось, что при всех испытанных температурных режимах происходит увеличение количества клеток в первые и во вторые сутки инкубации (рис. 2, см. Приложение). В пробах с горизонтов 2802 и 2974 м, инкубированных при 25 °С, отмечалось наиболее значительное возрастание численности бактерий, несмотря на то что исходное их количество было в 2–3 раза меньше, чем на других горизонтах, и они были законсервированы в ледниковой толще более длительное время и, соответственно, испытали более длительное действие анабиоза, температуры консервации, возрастающей с глубиной, и других сопутствующих факторов [10–15].

Вероятнее всего, разная реакция на температурное воздействие связана с тем, что клетки бактерий, находящиеся в пробах с разных горизонтов, имеют не только разную предысторию, но и отличаются по видовому составу и могут относиться к различным температурным группам. Так, при температуре 15 °С бактерии мезофильного типа не могут активно размножаться и участвовать в увеличении численности, однако могут сохранять жизнеспособность. Присутствующие в пробах психрофилы, как известно, вообще отличаются слабой активностью размножения даже в благоприятных для них условиях. Этим, возможно, объясняется наиболее слабое увеличение их численности при 15 °С. При 20 °С некоторые из представителей психрофилов могут сохранять жизнеспособность, но их размножение может быть заторможенным, в то время как некоторые из мезофилов могут проявлять при этой температуре большую активность, чем при 15 °С. Однако для большинства из них температура 25 °С все же более благоприятна. В связи с этим в наших экспериментах при данной температуре наблюдалось наибольшее увеличение суммарной численности бактерий, главным образом за счет размножения сохранивших жизнеспособность клеток мезофилов.

Полученные нами результаты, свидетельствующие о более высокой активности

размножения при 25 °С, послужили основанием для проведения экспериментов по инкубации проб при 18 и 28 °С – температурных значениях, пограничных для мезофильных типов бактерий.

В отличие от предыдущих опытов, влияние температурных условий испытывалось в пробах талой воды, полученных с одного и того же горизонта. При такой постановке экспериментов исключалось влияние различий в составе микрофлоры, количестве органических примесей и других факторов, характерных для каждого из горизонтов.

Показано, что во всех пробах в течение испытанных сроков инкубации (от трех до пяти суток) происходит размножение бактерий как при 18 °С, так и при 28 °С (рис. 3, см. Приложение). Тем не менее, вероятно в зависимости от состава микрофлоры, активность размножения микроорганизмов с горизонтов 708 и 1352 м (рис 3а и 3в) была выше при 28 °С, нежели при 18 °С. Особенно наглядно это выражено на первые – третьи сутки инкубации. На пятые сутки инкубации при 28 °С в пробе с горизонта 1352 м кривая резко снижается, очевидно ввиду более быстрого потребления органического субстрата активно размножающимися в первые сутки бактериями (рис. 3в), тогда как в пробе с горизонта 708 м происходило более медленное использование субстрата, небольшое количество которого сохранялось (рис. 3а).

В пробах с горизонтов 1097 и 1454 м в первые сутки развития активность размножения была выше при 18 °С, однако в дальнейшие сроки развития для микроорганизмов с горизонта 1454 м температура 28 °С оказалась более предпочтительной (рис. 3г). В пробах с глубины 1097 м размножение клеток во все сроки инкубации при 18° С происходило гораздо активнее, чем при 28 °С (рис. 3б). При этом скорость размножения в обоих случаях была довольно высокой, и сохранялась тенденция для дальнейшего роста. Вероятно, это связано не только с влиянием температуры, оптимальной для разных представителей мезофильной микрофлоры этого горизонта, но и с присутствием достаточно большого количества органического субстрата.

Основной результат экспериментов, представленных на рис. 3, заключается в том, что в испытанных нами пробах с горизонтов основной толщи ледникового покрова действительно присутствует мезофильная микрофлора с разными границами температуры, оптимальной для роста, в результате чего в одних случаях бактерии размножаются лучше при 18 °С, в других – при 28 °С. При этом наиболее показательными для реакции на температуру являются результаты первых суток развития, тогда как в более поздние сроки

инкубации активность размножения зависит и от других факторов, в том числе от присутствия в пробах большего или меньшего количества органического субстрата.

Обнаружение нами мезофильной микрофлоры в пробах основной толщи ледника (рис. 3) не исключает присутствия на этих горизонтах также и психрофилов, растущих при более низких температурах. Такая возможность вполне реальна, так как основная масса микроорганизмов заносится с поверхности океанов и заснеженных просторов Антарктиды, являющихся средой обитания этих бактерий.

Наше предположение нашло подтверждение в серии экспериментов, в которых пробы с одного и того же горизонта основной толщи ледника инкубировали при температурах 5, 10, 20 и 30 °С.

При инкубации проб с горизонтов 1899 и 2450 м заметное размножение клеток происходило как при 5 и 10 °С (рис. 4а, в, см. Приложение), так и при 20 и 30 °С (рис. 4б, г, см. Приложение), что послужило прямым доказательством присутствия в исследуемой пробе психрофилов и мезофилов. Размножение психрофилов при 10 °С было более активным, чем при 5 °С. Их количество уже через одни сутки инкубации увеличилось в 3,5 раза (от $2,0 \cdot 10^3$ до $7,1 \cdot 10^3$ кл/мл), а к десяти суткам – примерно в 6 раз (от $2,0 \cdot 10^3$ до $11,7 \cdot 10^3$ кл/мл). При 5 °С заметный прирост численности наблюдался только на третьи сутки, а к концу инкубации количество клеток возрастало лишь в 4,5 раз (от $2,0 \cdot 10^3$ до $9,1 \cdot 10^3$ кл/мл).

Как следует из рис. 4б, температура 30 °С, в отличие от 20 °С, способствовала более интенсивному размножению мезофильных бактерий, что приводило уже на третьи сутки инкубации к возрастанию численности клеток в 6 раз (от $2,0 \cdot 10^3$ до $12,1 \cdot 10^3$ кл/мл). Падение численности клеток, которое наблюдалось на пятые сутки инкубации при этой температуре, связано, очевидно, с исчерпанием субстрата при относительно высокой активности размножения бактерий в первые трое суток.

При 20 °С возрастание численности бактериальных клеток в течение всех сроков инкубации было менее значительным, и к пяти суткам она увеличилась всего в 3,6 раза (от $2,0 \cdot 10^3$ до $7,3 \cdot 10^3$ кл/мл). При этом характер кривой свидетельствовал о том, что полного исчезновения субстрата к этому сроку не происходило и оставалась тенденция к дальнейшему размножению.

Закономерности размножения бактерий в пробах с обоих горизонтов были

сходными, хотя активность размножения бактерий в пробе с горизонта 1899 м была более низкой. Вероятно, это связано не только с другим видовым составом бактерий в этой пробе, но и с более низким содержанием в ней органического вещества.

Итак, результаты проведенного эксперимента достаточно убедительно свидетельствуют о присутствии в исследуемых пробах как психрофильных, так и мезофильных типов микроорганизмов.

Примечательно, что данные, касающиеся динамики размножения мезофильных микроорганизмов в пробах с глубины 1352 м, которые были получены нами в предыдущей серии экспериментов (рис. 3в), весьма сходны с результатами инкубации проб с глубины 2450 м (рис. 4б), несмотря на то, что исследованные нами пробы разделяет глубина примерно в одну тысячу метров (что соответствует разнице в возрасте в 100–150 тысяч лет). Интерпретировать подобное наблюдение довольно сложно, однако можно сделать предположение о некотором сходстве микрофлоры на этих горизонтах и о том, что различия в длительности анабиоза в несколько сотен тысяч лет и воздействие других факторов (изменение температуры консервации и давления, различия в структуре льда на разных уровнях ледниковой толщи и др.) практически не влияют на жизнеспособность клеток бактерий, находящихся в покоящемся состоянии.

В настоящее время на основе экспериментальных данных развивается представление о том, что комплекс факторов оказывает меньшее влияние на жизнеспособность живых дрожжевых и бактериальных клеток, по сравнению с отдельными факторами [22, 23]. Имея в виду данные этих авторов, можно полагать, что суммарное влияние факторов на микроорганизмы, находящиеся в толще ледника в состоянии анабиоза, не столь значительно и что сохранение жизнеспособности бактериальных клеток, скорее всего, связано с их индивидуальными особенностями и с тем физиологическим состоянием, в котором они находились в момент обезвоживания и во время выхода из анабиотического состояния.

При этом большое значение имеют условия, созданные для реактивации и последующего размножения бактерий. Экспериментально было установлено, что на размножение бактерий, сохранивших жизнеспособность и переживших разного рода экстремальные воздействия, наряду с количеством органического субстрата в среде и степенью ее обводненности большое влияние оказывает температурный фактор. Создание определенных температурных режимов позволяет выявить в пробах различные

температурные группы микроорганизмов, такие как психрофилы и мезофилы.

Полученные результаты позволяют сделать по крайней мере два существенных вывода общебиологического значения. Во-первых, микроорганизмы, извлеченные из ледниковой толщи, характеризуются большой устойчивостью к замораживанию и могут сохранять жизнеспособность в условиях холодового анабиоза в течение длительного времени. Во-вторых, на планете Земля в периоды, соответствующие возрасту исследованных горизонтов, климатические условия были достаточно благоприятными для существования как психрофильных, так и мезофильных типов микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абызов С.С., Мицкевич И.Н., Поглазова М.Н.* Микрофлора древнейших горизонтов ледника Центральной Антарктиды // *Микробиология*. 1998. Т. 67, вып. 4. С. 547–555.
2. *Абызов С.С., Мицкевич И.Н., Поглазова М.Н.* и др. Ледниковый щит Центральной Антарктиды как объект изучения прошлых экологических событий на Земле // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1998. № 5. С. 610–616.
3. *Abyzov S.S., Mitskevich I.N., Poglazova M.N.* Antarctic ice sheet as an object for solving some methodological problems of exobiology // *Adv. Space Res.* 1999. Vol. 23, N 2. P. 371–376.
4. *Поглазова М.Н., Мицкевич И.Н., Абызов С.С., Иванов М.В.* Микробиологическая характеристика аккреционного льда над озером Восток (Антарктида) // *Микробиология*. 2001. Т. 70, вып. 6. С. 838–846.
5. *Abyzov S.S., Fukuchi M., Imura S.* et al. Biological investigations of the Antarctic ice sheet: review, problems and projects // *Polar Biosci.* 2004. N 17. P. 106–116.
6. *Abyzov S.S.* Microorganisms in the Antarctic ice // *Antarctic microbiology* / ed. E.I. Friedman. N.Y., 1993. P. 265–295.
7. *Короткевич Е.С.* Температурный режим // *Полярные пустыни*. Л.: Гидрометеиздат, 1972. 419 с.
8. *Удельнова И.М.* Цитофизиологические исследования анабиотического состояния микробной клетки // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1957. № 1. С. 67–78.
9. *Рапопорт А.И., Мейсель М.Н.* О люминесцентно-микроскопическом определении выживаемости дрожжевых организмов после обезвоживания // *Микробиология*.

1985. Т. 54, вып. 1. С. 66–68.
10. *Nei T., Araci T., Matasusaka T.* Freezing injuri to aerated and non-aerated cultures *E. coli* // Freezing and drying of microorganisms. Tokyo, 1969. P. 3–15.
 11. *Calcott P.H., Lee S.K., MacLeod R.A.* The effect of cooling and warming rates on the survival of a variety bacteria // *Canad. J. Microbiol.* 1976. Vol. 22, N 1. P. 106–109.
 12. *Mackenzie A.P.* Comparative studies of the freeze-drying survival of various bacteria; Gram type, suspending medium and freezing rate // *Develop. Biol. Stand.* 1977. Vol. 36. P. 263–276.
 13. *Mazur P.* The role of the intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates // *Cryobiology.* 1977. Vol. 14, N 3. P. 251–272.
 14. *Цуцаева А.А., Сафонова Т.С., Микулинский Ю.Е.* и др. Влияние различных режимов замораживания-оттаивания на некоторые виды бактерий // *Криобиология и криомедицина.* 1977. № 3. С. 55–57.
 15. *Цуцаева А.А., Сафонова Т.С., Высеканцев И.П.* и др. Влияние физиологического состояния клеток *E. coli* на чувствительность к действию низких температур // *Микробиология.* 1980. Т. 49, № 1. С. 179–182.
 16. *Кудряшов Б.Б., Чистяков В.К., Васильев Н.И.* и др. Бурение и исследование глубокой скважины на станции Восток // *Результаты исследований Антарктики: сб. ст.* СПб., 1995. Вып. 1. С. 80–82.
 17. *Липенков В.Я., Барков Н.И., Саламатин А.Н.* История климата и оледенения Антарктиды по результатам изучения ледяного ядра со станции Восток // *Проблемы Арктики и Антарктики: Юбилейный выпуск.* СПб., 2000. С. 197–236.
 18. *Абызов С.С., Кудряшов Б.Б., Бобин Н.Е.* Разработка технических средств отбора проб льда для микробиологических исследований в Антарктиде // *Антарктика.* 1977. №16. С. 154–160.
 19. *Поглазова М.Н., Мицкевич И.Н.* Применение флуорескамина для определения общего количества микроорганизмов в морской воде эпифлуоресцентным методом // *Микробиология.* 1984. Т. 53, № 5. С. 850–858.
 20. *Priscu J.C., Adams E.E., Lyons W.B.* et al. Geomicrobiology of subglacial ice above lake Vostok, Antarctica // *Science.* 1999. Vol. 286. P. 2141–2144.
 21. *Mazur P.* Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing // *Cryobiology.* N.Y.; London, 1966. P. 213–315.

22. Арзуманян В.Г., Воронина Н.А., Гейдебрехт О.В. и др. Антагонистическое взаимодействие стрессорных факторов при росте микроорганизмов в условиях, имитирующих параметры их природных экотипов // Микробиология. 2002. Т. 71, вып. 1. С. 160–165.
23. Nichols D.S., Olley L., Garda H. et al. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. P. 2422–2429.

ПРИЛОЖЕНИЕ

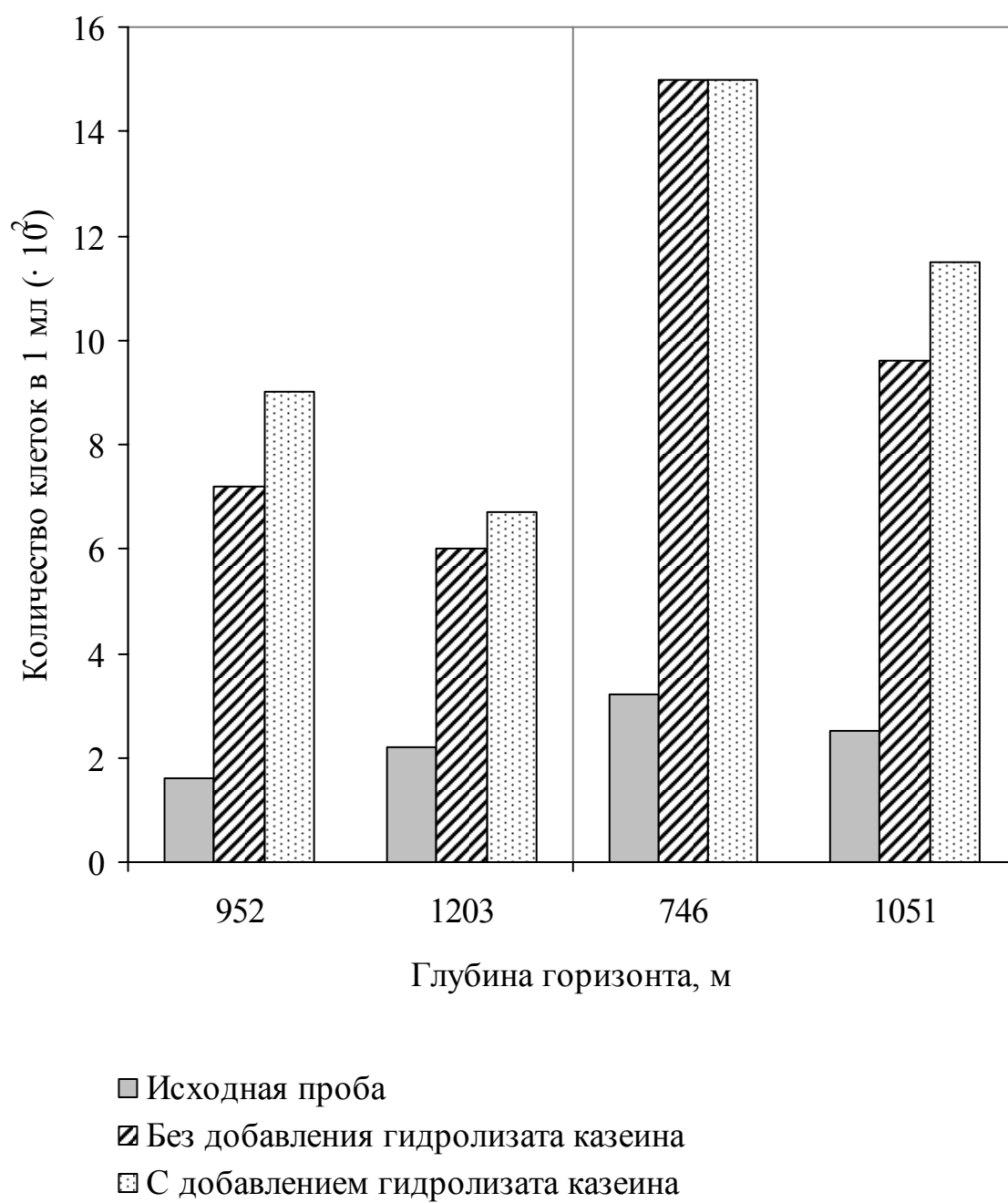


Рис. 1. Влияние органических добавок (гидролизат казеина) на размножение бактерий в пробах талой воды

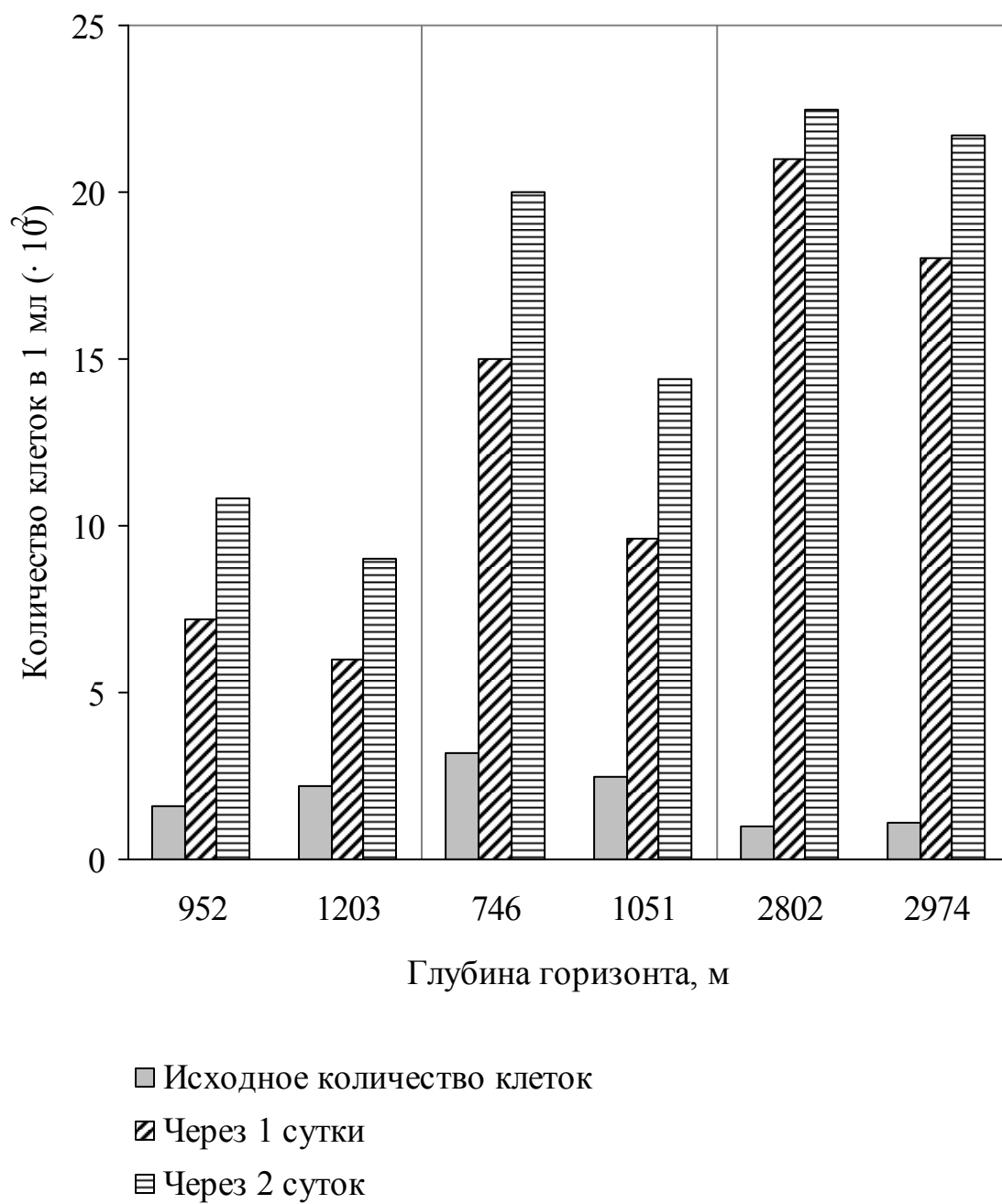
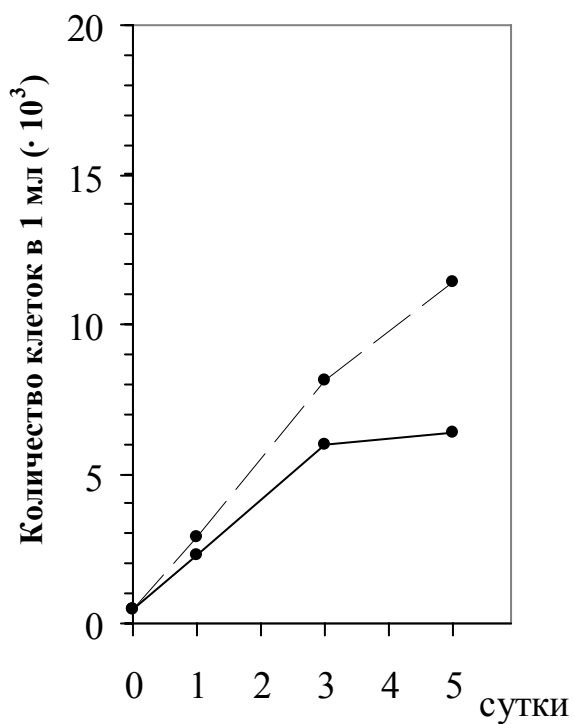
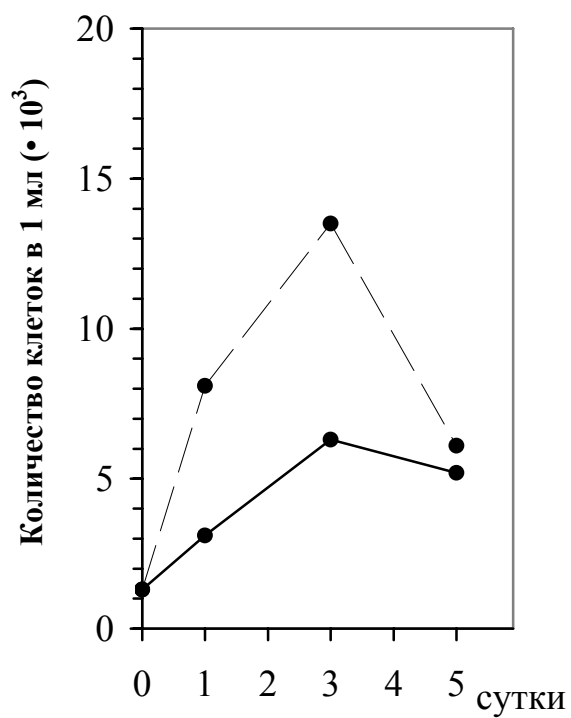


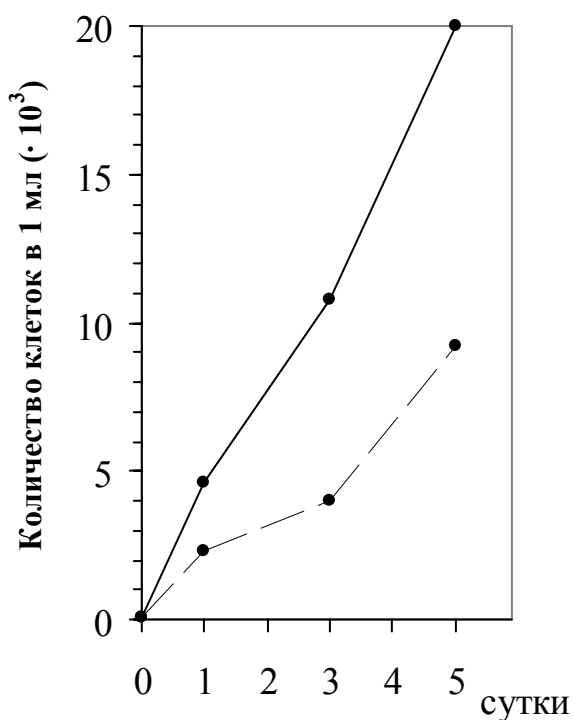
Рис. 2. Размножение бактерий в пробах талой воды при разной температуре



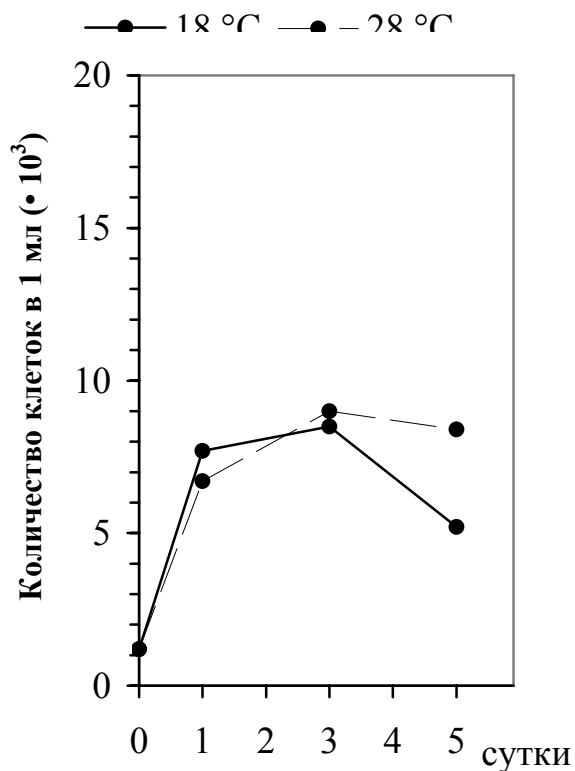
а



б

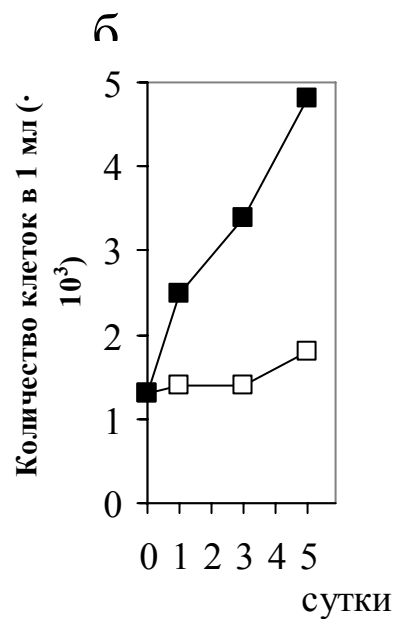
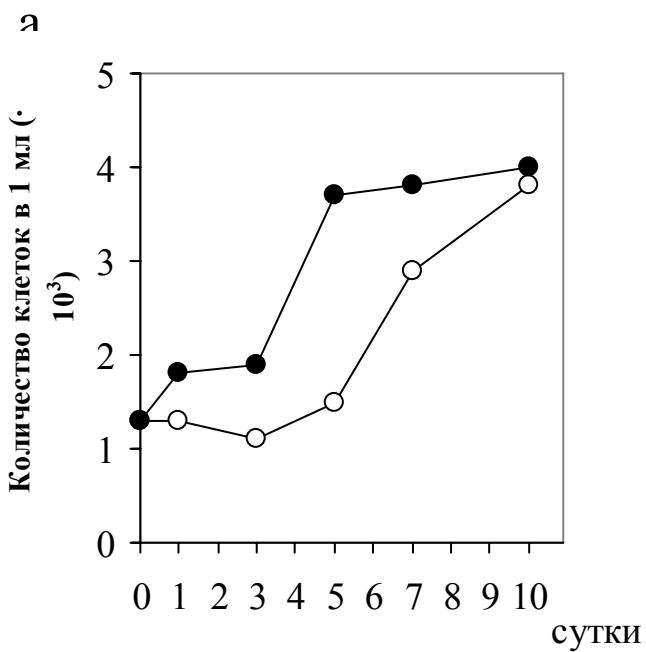
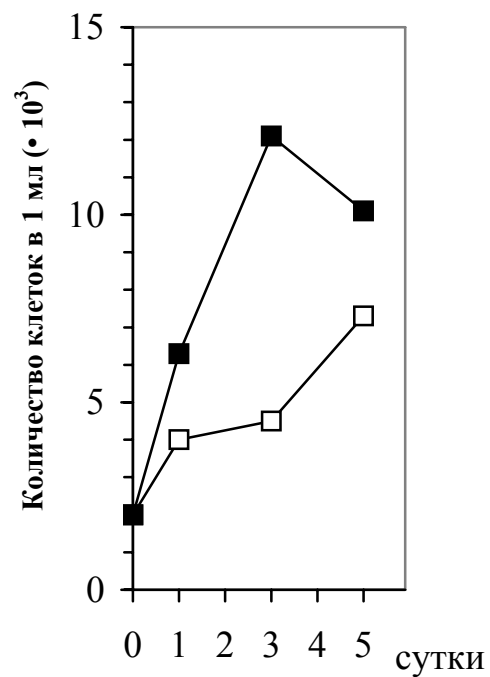
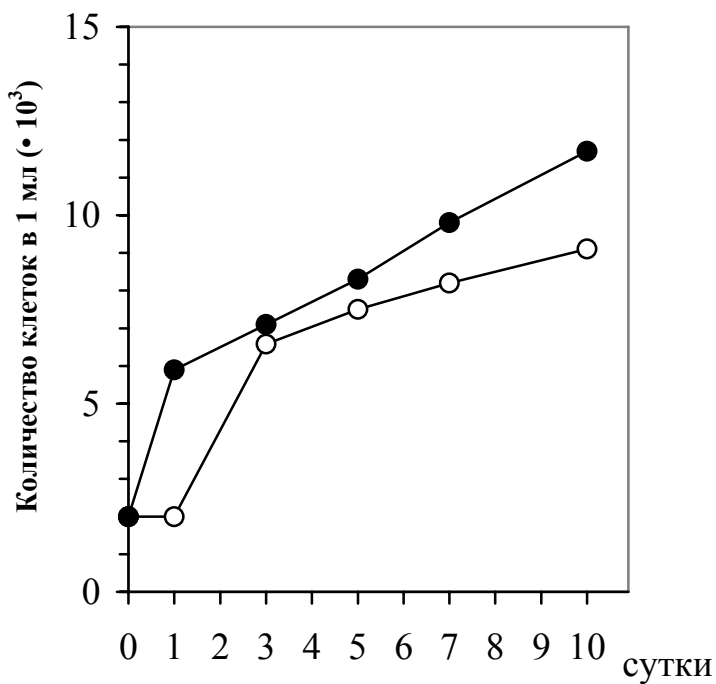


в



г

Рис. 3. Размножение бактерий в пробах талой воды, инкубированных при температуре 18° С и 28° С в течение 5 суток с разных глубин: а – 708 м, б – 1097 м, в – 1352 м, г – 14554 м



в

г

○ — 5 °C

● — 10 °C

□ — 20 °C

■ — 30 °C

Рис. 4. Размножение бактерий в пробах талой воды с горизонта 2450 м при разных температурах:
 а — 5 и 10 °C; б — 20 и 30 °C

a, б – горизонт 2450 м; *в, г* – горизонт 1899 м