

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ И ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ ПРИ ИХ ВЫТАИВАНИИ ИЗ АРКТИЧЕСКИХ МЕРЗЛОТНЫХ СЛОЕВ

Складнев Д.А.<sup>1</sup>, Брушков А.В.<sup>2</sup>, Мулюкин А.Л.<sup>1</sup>, Филиппова С.Н.<sup>1</sup>, Куликов Е.Е.<sup>1</sup>,  
Летарова М.А.<sup>1</sup>, Юзбашева Е.А.<sup>3</sup>, Карнышева Э.А.<sup>2</sup>, Гальченко В.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН (ИНМИ РАН),  
Москва, Россия

<sup>2</sup> Геологический ф-т, каф. Геокриологии, МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГУП генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика),  
Москва, Россия

*valgalch@inmi.host.ru*

Микроорганизмы экологических ниш приполярных районов, в частности, обнаруживаемые в толще вечномёрзлых льдов, вызывают особый интерес, поскольку в условиях длительного низкотемпературного хранения их древние формы могут присутствовать в жизнеспособном виде [1-4]. Практически все микробиологические исследования приполярных экологических ниш посвящены установлению таксономического состава соответствующих микробиот [5-8], а также определению молекулярных механизмов сохранения биоструктур в условиях длительного замораживания [9-14]. В нативных пробах чаще всего оценивают численность и разнообразие культивируемых аэробных гетеротрофных микроорганизмов [15-18]. Вместе с тем, очевидно, что не менее важно уметь оценивать перемещение клеток микроорганизмов и вирусов (бактериофагов) с водными и воздушными потоками – как по поверхности, так и по капиллярам и трещинам вечномёрзлых льдов.

Настоящее исследование предпринято для оценки динамики распространения модельных микроорганизмов и фаговых частиц, вносимых по определённой схеме непосредственно в зону вытаявания льда вечномёрзлых слоев. Предполагалось, что закономерности распространения модельных биологических объектов аналогичны закономерностям распространения микроорганизмов и бактериофагов биоты пермафроста.

В качестве биологических маркеров использовали два вида микроорганизмов и два вида бактериофагов. Эукариотным маркером была выбрана специально сконструированная культура непатогенных аскомицетных дрожжей *Yarrowia lipolytica* Y-3603 [19-21]. Клетки *Y. lipolytica* Y-3603 были генетически маркированы геном красного флуоресцентного белка TurboFP635, ковалентно связанного с поверхностным белком клеточной стенки YIPir1. В лабораторных условиях клетки *Y. lipolytica* Y-3603 детектировали по специфическому фенотипу окрашенных колоний на средах с антибиотиками, а также окрашенных клеток методом флуоресцентной микроскопии.

В качестве бактериального маркера в эксперименте использовали культуру актинобактерии Л18, выделенную ранее из ледяной жилы в этом же районе Мамонтовой горы. По данным анализа 16S rRNA культура Л18 имела высокое сходство с представителями трех видов родококков *Dietzia*: *D. natronolimnaea*, *D. daginensis*, *D. psychrphilipha* (99%) [22]. Клетки данной культуры детектировали в отобранных пробах по специфическому фенотипу пигментированных колоний.

В качестве вирусных моделей использовали два существенно различающихся бактериофага, имеющих узкий круг энтеробактериальных хозяев. Фаг G7C образует

чёткие негативные колонии на газоне культуры *Escherichia coli* 4s [23], тогда как фаг 9G образует мелкие негативные колонии на штамме *E.coli* C600. Для титрования разведенные природные пробы наносили на газоны штаммов-хозяев в пяти повторностях. Детекцию фаговых частиц и их численность проводили путём подсчёта негативных колоний на сплошном газоне бактериальных хозяев.

Эксперимент проводили в Центральной Якутии на Мамонтовой горе на левом берегу реки Алдан. Маркерные культуры микроорганизмов и бактериофагов вносили в двух точках: у подножия слоя обнажения вытаявающего льда и у истока ручья из сборного водоема цирка вытаивания ледяной жилы (рис. 1, точки 1 и 2).

Водные суспензии образцов для внесения в зону вытаивания льда готовили непосредственно на месте эксперимента путём ресуспендирования в ручейной воде выращенных в лаборатории дрожжевых, микробных и фаговых препаратов. Образец для внесения в точке 1 содержал пасту клеток дрожжей *Y. lipolytica* (1150 г) и суспензию частиц фага G7C (200 мл,  $10^{11}$  БОЕ/мл), в конечном объёме 2,5 л. В образце, внесённом в точку 2 (общий объём 500 мл), содержалось 100 мл суспензии клеток актинобактерий *Dietzia sp.* ( $4,8 \cdot 10^8$  КОЕ/мл) и 200 мл суспензии фаговых частиц 9G ( $10^{11}$  БОЕ/мл).

Важно подчеркнуть, что в работе было учтено обязательное требование к культурам вносимых биомаркеров – они не должны нарушать видовой состав природной биоты исследуемого района. Соответственно, нами были выбраны четыре экологически безопасные, но существенно различающихся биологических объекта: непатогенные дрожжи *Y. lipolytica*, культура актинобактерий *Dietzia sp.*, ранее выделенная из исследуемой криозоны и два вида чётко различимых бактериофагов.

Скорость распространения модельных биологических объектов оценивали путём отбора проб ручейной воды с определёнными временными интервалами в трёх точках (рис. 1, точки 2-4). До внесения биообъектов были отобраны контрольные пробы ручейной воды в каждой из четырех экспериментальных точек. Всего было отобрано 28 проб с различным временем задержки. Пробы ручейной воды отбирали в стерильные пластиковые пробирки (50 мл) с крышками. Все пробы хранили и транспортировали при температуре 10-12°C и обрабатывали в лабораторных условиях в ИНМИ РАН через 3 суток.

Наиболее выраженные участки обнажений слоя льда вечной мерзлоты в районе Мамонтовой горы находятся на берегу реки Алдан. В обнажении третьей террасы вскрываются аллювиальные отложения, заполнявшие Нижнеалданский прогиб, развитый вдоль зоны сочленения Предверхоанского краевого прогиба с Сибирской платформой. В нижней части разреза вскрываются пески и супеси среднеплейстоценового возраста. Они содержат частые горизонтальные прослойки пойменных супесей, хорошо увлажненных за счет цементирующего льда. Выше залегает ледовый комплекс с мощными ледяными жилами позднеплейстоценового и голоценового возрастов. Геологические данные показывают, что похолодание и связанное с ним промерзание отложений началось здесь в конце плиоцена (около 2,5-1,8 млн. лет назад). Криолитологические индикаторы – жильные льды, залегающие выше по разрезу, свидетельствуют об отсутствии протаивания мерзлой толщи в голоценовый оптимум [2].

У подножья каждого обнажения льда встречается участок с ограниченным водным объёмом, в котором талая вода застаивается перед вытеканием к реке (рис. 1). Соответственно, для вытаявающих микроорганизмов и фаговых частиц чётко различаются два этапа распространения: первый – от поверхности льда вместе с талой водой до сборного водоема, и второй – от этого водоема по ручью до реки. Для измерения скорости перемещения на этих двух этапах была выбрана схема внесения двух пар различных биомаркеров в двух независимых точках 1 и 2 (рис. 1). Как видно

из схемы, биомаркеры, внесённые в точке 1, имеют возможность преодолеть максимальное расстояние непосредственно от обнажённого льда до реки Алдан, тогда как при внесении в точке 2 биомаркеры способны перемещаться только в пределах ручья.

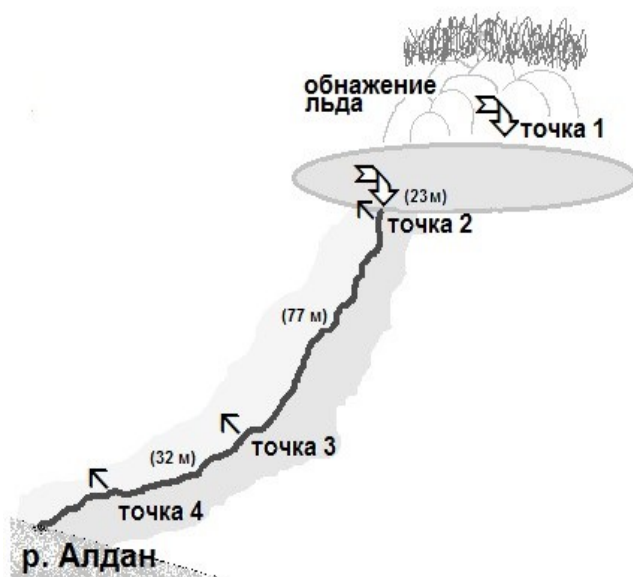


Рисунок 1.

Зона обнажения льда вечной мерзлоты, в которой проводили эксперимент. В точке 1 у подножья слоя вытаивающего льда вносили дрожжи *Y. lipolytica* и фаг G7C. В точке 2 у истока ручья вносили актинобактерии *Dietzia* J18 и фаг 9G. Пробы ручейной воды для обнаружения внесённых модельных биообъектов отбирали в точках 2, 3, 4. В скобках указано расстояние между соседними точками отбора проб.

В точках 2 и 3 расход воды составлял 4 л/мин и 6 л/мин, соответственно. Скорость потока ручейной воды в точке 3 составляла 1 м/сек. Была отмечена выраженная неравномерность потока, скорее всего, связанная с возможностью формирования временных заторов из-за скопления уносимых структурных компонентов – песка, глины, фрагментов растительности.

Поскольку ручейная вода отличалась высоким содержанием нерастворимых компонентов, были определены объёмные доли твердых осадков в отобранных пробах. Максимальная объёмная доля осадков (60 об.%) наблюдалась в пробах, отобранных в месте излива ручья из сборного водоема (точка 2), и снижалась по мере приближения к реке Алдан (до 37 об.%). В воде, вытаивающей из льда пермафроста (точка 1), объёмная доля осадков была минимальна – 2 об.%.

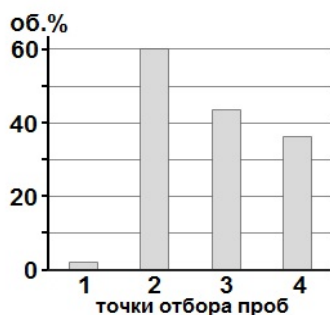


Рисунок 2.

Объёмная доля нерастворимых компонентов в пробах ручейной воды.

Исходная суспензия *Y. lipolytica* до внесения на поверхность льда (рис.1, точка 1) содержала  $10^6$  КОЕ/мл дрожжей (рис. 3А). Первая проба в точке 2 у излива ручья (23 метра) была отобрана через 10 минут. В этих пробах наблюдалась убыль концентрации клеток дрожжей: через 10 минут –  $2 \cdot 10^3$  КОЕ/мл, а через 30 мин. –  $5 \cdot 10^2$  КОЕ/мл, что указывает на относительно быстрое распределение клеток биомаркера по объёму сборного водоема. При перемещении по ручью дрожжи также рассеивались в потоке –

снижался их титр в пробах из среднего течения ручья (рис.1, точка 3;  $1-3 \cdot 10^1$  КОЕ/мл). Слабо выраженное «пятно микроорганизмов» весь путь (142 м) от точки внесения до нижней точки отбора проб (рис.2, точка 4) «прошло» за 35 мин. Анализ проб ручейной воды, отобранных через сутки после внесения *Y. lipolitica*, показал наличие жизнеспособных клеток дрожжей в низкой концентрации только в пробе из точки 4 (рис. 3А).

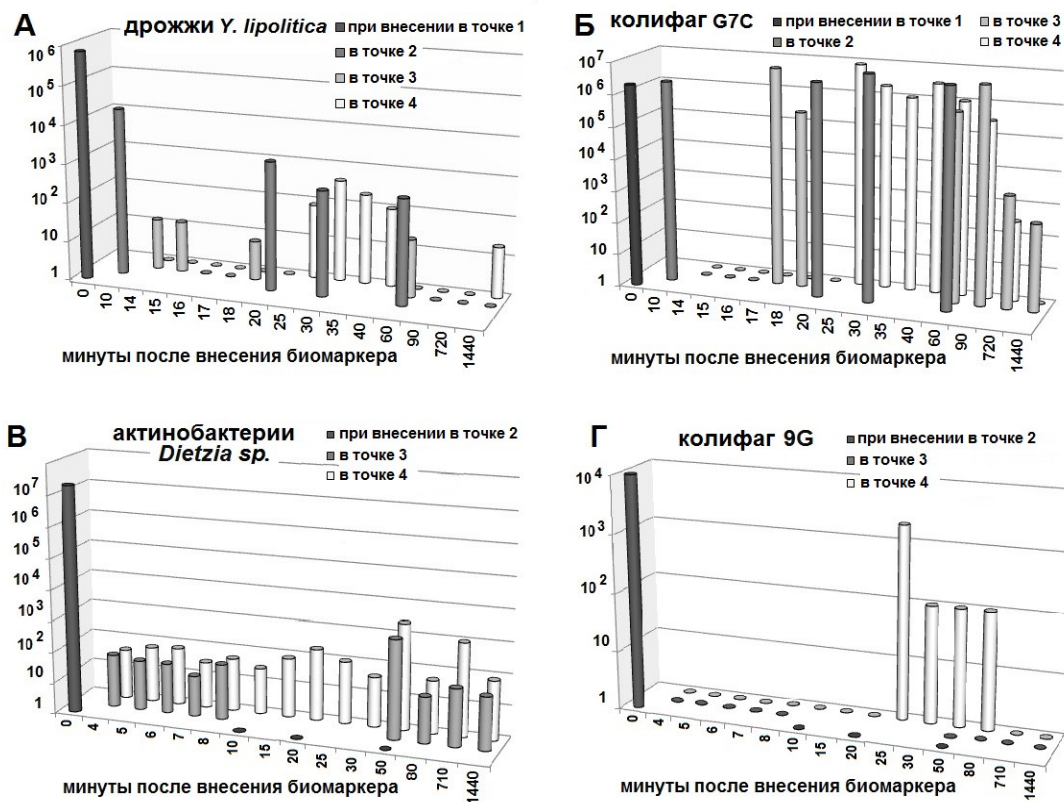


Рисунок 3. Содержание жизнеспособных клеток (А,В – КОЕ/мл) и активных фаговых частиц (Б,Г – БОЕ/мл) в пробах воды, отобранных в разных точках. Указаны интервалы между моментом внесения биомаркеров (время «0») и моментом отбором пробы.

Суспензию частиц бактериофага G7C вносили непосредственно на лёд вместе с клетками *Y. lipolitica* в концентрации  $2 \cdot 10^6$  БОЕ/мл. Поскольку в пробах, отобранных в изливе в течение часа, титр фага G7C практически не изменялся, содержание фаговых частиц в сборном водоёме можно оценить как относительно стабильное –  $4-9 \cdot 10^6$  БОЕ/мл (рис. 3Б). Основное «пятно», содержащее максимальное число фаговых частиц, перемещалось по ручью пропорционально скорости потока, поскольку из точки 2 в точку 3 (расстояние 77 м) «пятно» приходило за 7 минут, а в точку 4 (32 м) – через 15 минут. Весь путь от участка внесения на подножье ледяного обнажения до нижней точки отбора проб (142 м) «пятно» частиц фага прошло за 25 мин. В пробах, отобранных в нижних точках ручья через 12 часов, было отмечено существенное снижение присутствия активных фаговых частиц, а к 24 часу истощались и они. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что оба биомаркера (дрожжи *Y. lipolitica* и бактериофаг G7C), внесённые на поверхность вытаивающего льда, преодолели расстояние 142 метра за 25 минут.

Особенностью бактериального биомаркера – актинобактерий (родококков) *Dietzia sp.* Л18, внесённого в точку 2, является то, что при визуальной идентификации актинобактерий можно опираться только на размер, форму и цвет колоний. Для определения фонового уровня присутствия аборигенных таксономически и фенотипически близких родококков провели анализ отобранных контрольных проб. Подсчёт характерных пигментированных колоний показал присутствие природного фона родококков в нижнем течении изучаемого ручья в количестве 10-70 КОЕ/мл. Поскольку приготовленная нами суспензия *Dietzia sp.* Л18 для внесения в ручей содержала  $5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, даже на фоне аборигенных родококков удалось легко наблюдать перемещение «пятна» внесённых модельных актинобактерий (рис. 3В). Путь от начала ручья до нижней точки отбора проб (109 м) «пятно» прошло за 30 минут. После этого в точке 4 наблюдали второй, более выраженный пик родококков ( $2 \cdot 3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл). Подобный характер перемещения биомаркера может указывать на возможность ассоциированности клеток *Dietzia* с некими подвижными компонентами в потоке вытаивающей воды.

Использование в качестве биомаркера фага 9G дало минимальную информацию, поскольку концентрация исходной суспензии по неясной причине резко снизилась до  $2 \cdot 10^4$  фаговых частиц/мл (рис. 3Г). Тем не менее, удалось установить, что путь от точки внесения в начало ручья до точки 4 слабо выраженное «пятно» вирусных частиц прошло за 25 минут. В случае фага 9G наблюдали полное отсутствие активных вирусных частиц во всех пробах, отобранных в точке 3, тогда как в пробах из точки 4, расположенной ниже по течению ручья, они присутствовали.

Предложенный комплексный метод, основанный на использовании множественных биологических маркеров, вносимых в исследуемую природную зону, позволил провести оценку скорости распространения микроорганизмов и вирусных частиц в зоне вытаивания льда вечной мерзлоты. Полученные данные указывают на то, что каждый из четырёх биологических объектов имеет собственные характеристики перемещения в потоке ручейной воды. Было показано, что каждый из них способен преодолеть вместе с ручейной водой расстояние 140 метров за 35 мин.

На основании данных эксперимента сделано предварительное заключение, что в значительной степени распространение биологических объектов, а, возможно, и их выживаемость в потоках в естественных экологических условиях зависят от сорбции на структурных элементах потоков. Информация о динамике перемещения самих структурных нерастворимых компонентов потока помогла бы выяснить, ассоциированы или нет модельные клетки и вирусные частицы с теми или иными природными компонентами потока.

Динамика перемещения и распределение жизнеспособных частиц фагов G7C и 9G существенно различались. Так концентрация частиц 9G практически сразу после внесения в ручейную воду упала до номинально обнаружимого уровня. Напротив, колифаг G7C обнаруживался в неизменно высокой концентрации, как во всех пробах из сборного водоёма, так и в ручейных пробах. Частицы этого фага обнаруживались в пробах ручейной воды в течение суток после внесения. В целом можно заключить, что суспензия частиц колифага G7C очень удобна для использования в качестве модельного биообъекта в полевых исследованиях.

Использование в данном экологическом эксперименте непатогенных дрожжей *Y. lipolytica*, генетически маркированных геном красного флуоресцентного белка, показало, что эта культура наиболее удобна для использования в качестве модельного биообъекта. Возможность оценивать не только фенотипические признаки колоний, но и применять высокоселективную среду с добавлением в среду культивирования в лабораторных условиях трёх антибиотиков для выявления данного микроорганизма, существенно повышало точность обнаружения клеток этого модельного биообъекта.

Именно из-за таких свойств данная культура генетически маркированных дрожжей *Y. lipolytica* была использована для определения скорости перемещения клеток микроорганизмов на всём протяжении пути от поверхности вытаивающего льда до реки Алдан.

Интерес к использованию в данном исследовании культуры актинобактерий *Dietzia sp.* Л18, определялся тем, что она была выделена непосредственно из проб льда, отобранных в районе Мамонтовой горы. Высокая концентрация клеток в исходном препарате позволила оценить динамику перемещения клеток в вытаивающей воде даже при наличии в потоке ручейной воды заметного уровня аборигенных родококков. Тем не менее, для дальнейшего использования актинобактерий *Dietzia sp.* удобнее использовать генетически маркированный вариант культуры.

Сопоставление динамики перемещения и распределение жизнеспособных клеток или вирусных частиц четырёх использованных модельных биологических маркеров позволило сделать следующие заключения.

1. Каждый из четырёх биологических объектов имеет собственные характеристики перемещения в сборном водоёме и в потоке ручейной воды. Информация о динамике перемещения самих структурных нерастворимых компонентов потока помогла бы выяснить, ассоциированы или нет модельные клетки и вирусные частицы с теми или иными природными компонентами потока.
2. Сравнение динамики перемещения и распределение жизнеспособных частиц колифагов G7C и 9G показывает, что только первый из них в течение суток присутствует в исследуемом ручье, тогда как концентрация второго практически сразу после внесения в ручей падает до номинально обнаружимого уровня.
3. Наличие в потоке ручейной воды относительно высокого уровня аборигенных родококков не помешало оценить динамику перемещения клеток этой бактериальной культуры в вытаивающей воде. Тем не менее, использование более удобного биомаркера (клеток дрожжей *Y. lipolytica*) выглядит предпочтительным.

В целом успешное применение предложенного нового комплексного метода позволило не только оценить способность и динамику перемещения микроорганизмов и фаговых частиц в естественных экологических условиях арктической зоны, но и сформулировать вопросы для последующих исследований перемещения компонентов природных микробиот. Стало очевидно, что необходимо развивать исследования связи между способностью поверхностных перемещений микробиологических объектов и фагов с их сорбцией на структурных (минеральных) элементах потоков.

1. D.A. Gilichinsky, G.S. Wilson, E.I. Friedmann, C.P. McKay, R.S. Sletten, Rivkina E.M., Vishnivetskaya T.A., Erokhina L.G., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Shcherbakova V.A., Soina V.S., Spirina E.V., Vorobyova E.A., Fyodorov-Davydov D.G., Hallet B., Ozerskaya S.M., Sorokovikov V.A., Laurinavichyus K.S., Shatilovich A.V., Chanton J.P., Ostroumov V.E., Tiedje J.M. *Astrobiology*, 2007, **7**, 275-311.
2. В.П. Мельников, В.В. Рогов, А.Н. Курчатова, А.В. Брушков, Г.И. Грива. *Криосфера Земли*, 2011, **15**, 86-90.
3. R.C. Wilhelm, T.D. Niederberger, C. Greer, L.G. Whyte. *Can. J. Microbiol.*, 2011, **57**, 303-15.
4. T.L. Meiring, M. Tuffin, Cary Craig, Cowan D.A. *Extremophiles*, 2012, **16**, 715-26.
5. С.Н. Филиппова, Н.А. Сургучева, Куликов Е.Е., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Бейдж А.К., Маккей К., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. *Микробиология*, 2013, **82**, 383-86.
6. K. Junge, F. Imhoff, Staley T., Deming J.W. *Microb. Ecol.*, 2002, **43**, 315-28.

7. B. Steven, R. Léveillé, Pollard W.H., Whyte L.G. *Extremophiles*, 2006, **10**, 259-67.
8. T. Segawa, Y. Yoshimura, Watanabe K., Kanda H., Kohshima S. *Polar Sci.*, 2011, **5**, 41-51.
9. F. Piette, S. D'Amico, Struvay C., G. Mazzucchelli, J. Renaut, M.L. Tutino, A. Danchin, P. Leprince, G. Feller *Mol. Microbiol.*, 2010, **76**, 120-32.
10. M. Mitova, M.L. Tutino, G. Infusini, G. Marino, S. De Rosa *Mar. Biotechnol.* (NY), 2005, **7**, 523-31.
11. R. Papa, V. Rippa, A. Duilio. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, **295**, 177-86.
12. D. Satory, A.J.E. Gordon, Halliday J.A., Christophe H. *Cur. Opin. Microbiol.*, 2011, **14**, 212-17.
13. A. Merlino, K.I. Russo, I. Castellano, E. De Vendittis, B. Rossi, M. Conte, A. Vergara, F. Sica. *J. Struct. Biol.*, 2010, **172**, 343-52.
14. Н.А. Кряжевских, Е.В. Демкина, Н.Г. Лойко, Р.В. Баслеров, Т.В. Колганова, В.С. Соина, Н.А. Манучарова, В.Ф. Гальченко, Г.И. Эль-Регистан *Микробиология*, 2013, **82**, 29-36.
15. А.Л. Мулюкин, Е.В. Демкина, Н.А. Манучарова, В.Н. Акимов, Д. Андерсен, К. МакКэй, В.Ф. Гальченко. *Микробиология*, 2014, **83**, 215-24.
16. K.E. Williamson, M. Radosevich, D.W. Smith, K.E. Wommack. *Environ. Microbiol.*, 2007, **9**, 2563-74.
17. Н.А. Кряжевских, Е.В. Демкина, Н.А. Манучарова, В.С. Соина, В.Ф. Гальченко, Г.И. Эль-Регистан. *Микробиология*, 2012, Т.**81**(4). С.474-85.
18. А.Л. Мулюкин, В.В. Сорокин, Е.А. Воробьева, Н.Е. Сузина, В.И. Дуда, В.Ф. Гальченко, Г.И. Эль-Регистан. *Микробиология*, 2002, **71**, 836-48.
19. C. Scioli, L. Vollaro. *Water Research*, 1997, **31**, 2520-24.
20. E.Y., Yuzbashev T.V., I.A. Laptev, Konstantinova T.K., Sineoky S.P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **91**, 645-54.
21. S. Zinjarde, M. Apte, P. Mohite, A.R. Kumar. *Biotechnol. Adv.*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.008>
22. R.J. Koerner, M. Goodfellow, A.L. Jones. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2009, **55**, 296-305.
23. Е.Е. Kulikov, A.M. Kropinski, A. Golomidova, E. Lingohr, V.M. Govorun, M. Serebryakova, N. Prokhorov, M.A. Letarova, A. Manykin, A. Strotskaya, A. Letarov *Virology*, 2012, **426**, 93-99.