

## БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В КЕРОСИН-СОДЕРЖАЩЕЙ ЖИДКОСТИ ДЛЯ БУРЕНИЯ ИЗ ГЛУБОКОЙ СКВАЖИНЫ ВОСТОК, АНТАРКТИДА

И.А.Алехина<sup>1</sup>, Д. Мари<sup>2</sup>, Ж.Р. Пету<sup>3</sup>, В.В. Лукин<sup>4</sup>, М.В.Зубков<sup>5</sup>, С.А. Булат<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Петербургский Институт Ядерной Физики РАН, Санкт Петербург-Гатчина, Россия.

<sup>2</sup>Биологическая Станция НЦНИ, Роскофф, Франция.

<sup>3</sup>Лаборатория Гляциологии и Геофизики Окружающей Среды НЦНИ, Гренобль, Франция.

<sup>4</sup>Институт Арктики и Антарктики, Санкт Петербург, Россия.

<sup>5</sup>Петербургский Горный Институт, Санкт Петербург, Россия.

Поиск следов микробной жизни в экстремальных ледовых условиях на Земле продолжает представлять много нерешенных задач [1]. Одним из важнейших вопросов при анализе кернов полярного льда остается проблема контаминации, т.е. степень загрязнения этого керна во время отбора и последующего анализа проб. Известные разногласия в результатах по микробиологии глубокого льда (от 10 до 10000 клеток на мл воды [2, 3]) могут отражать как различия между образцами, так и быть следствием различий в объеме образцов льда, аналитических процедурах и, главное, методах деконтаминации льда. Таким образом, для прояснения проблемы контаминации необходимо улучшить наше понимание микробного разнообразия и биомассы, которая может загрязнять образцы льда во время получения керна льда из скважины.

Деконтаминация льда керна Восток является критической стадией в молекулярно-филогенетическом изучении атмосферного льда и подледниковых озер. Поверхность керна льда покрыта липкой пленкой жидкости для бурения (БЖ), представляющей собой смесь алифатических и ароматических углеводородов и форанов, содержащую в изобилии микробные контаминанты, привнесенные в результате условий хранения и операций транспортировки и бурения.

Задачами нашего исследования являлись оценка микробного содержания БЖ как источника потенциального «forward»-загрязнения льда керна и оценка самой БЖ как возможной экстремальной экониши для бактерий, деградирующих углеводороды *in situ*. Дополнительной целью являлся сбор информации, необходимой для получения экологической оценки при дальнейшем исследовании Подледниковых Антарктических Озер (Subglacial Antarctic Lake Environments - SALE).

В нашем сообщении представлены данные по микробному содержанию и молекулярному разнообразию БЖ со станции Восток, отобранных прямо из скважины после трехлетнего периода консервации станции, когда не проводили ни бурения, ни каких-либо измерений. В сезон 2000-2001 гг. 46-й Российской Антарктической Экспедицией из скважины 5G (5G-1) было отобрано несколько образцов БЖ в диапазоне глубин 110 м - 3600 м. Из них для исследования выбрали 4 репрезентативных образца, различающиеся по композиции БЖ, температуре *in situ* и времени экспозиции в скважине при физиологической температуре, а также общему времени пребывания в скважине. Физиологическая температура в нашем определении означает наименьшую температуру (не ниже -20°C), при которой бактериальная активность была подтверждена экспериментально [4]. Тот же самый температурный порог, при котором микробы еще могут размножаться, в настоящее время предложено использовать при поиске внеземной жизни [5].

Микробные клетки были экстрагированы из образцов БЖ в водную фазу, используя оригинальный разработанный протокол. Выделение геномной ДНК и ПЦР амплификацию проводили стандартным образом [2]. В результате последующих клонирования и

секвенирования (90 клонов) было вскрыто 19 бактериальных филоотипов. Из них только 6 филоотипов (28 клонов) прошли все контроли на контаминацию и поэтому были расценены как происходящие непосредственно из БЖ Восток. Все 6 филоотипов были выявлены только в образцах с самого верхнего и двух нижних горизонтов, в то время как никаких филоотипов не было вскрыто в среднем горизонте (2750 м). Это полностью соответствует данным проточной цитофлуориметрии по подсчету клеток, полученным для вновь собранных образцов с соседних горизонтов. По предварительным данным в горизонтах 2500 м и 2700 м не было выявлено никаких клеток, тогда как в самых глубоких горизонтах (3300 м и 3564 м) концентрация клеток составила около  $10^2$  клеток/мл.

Два филоотипа - представители многочисленного рода *Sphingomonas* (Альфа-Протеобактерии) (*Sph. sp.* и родственные *Sph. natatoria*), доминировали по числу клонов (16 клонов из 28) и были вскрыты только в самых глубоких горизонтах – 3400 м и 3600 м, где находились при физиологической температуре в течение 3-4 лет. Поскольку ближайшие родственники, занесенные в мировые базы генов последовательностей, могли деградировать моно- и полиароматические углеводороды, то и данные два филоотипа *Sphingomonas* были отнесены к деструкторам БЖ, которые, вероятно, утилизируют *in situ* содержащиеся в ней ароматические углеводороды .

Три оставшихся филоотипа (из разных отделов бактерий) были вскрыты в образцах со 110 м и 3600 м и показали значительное сходство с последовательностями патогенов и/или сапрофитов человека и животных. В соответствии с разработанными критериями загрязнения БЖ [6] они были отнесены к контаминантам. Последний филоотип (образец с 3400 м) показал существенное родство с последовательностями некультивируемых бактерий из ризосферы растений и глубинных морских осадков, и в соответствии с теми же критериями был также отнесен к контаминантам.

Проведенный филогенетический анализ выявленных в БЖ двух филоотипов *Sphingomonas* дал дополнительную информацию. Оказалось, что несколько изолятов, конспецифичных по последовательности первому филоотипу *Sphingomonas sp.* и способных деградировать углеводороды, были выделены в холодных условиях Антарктики (Рис. 1). Например, *Sphingomonas sp.* штамм Ant20, изолированный из загрязненной углеводородами антарктической почвы, может утилизировать алкилбензолы (толуен и ксилен) и авиационное топливо JP-8, а также деградировать полиароматические соединения (нафтаден и фенантрен) [7]. Еще один штамм, *Sphingomonas sp.* 437D, изолированный из того же источника, может утилизировать фенантрен [7]. Второй филоотип из БЖ, родственник *Sph. natatoria*, оказался конспецифичным по последовательности изоляту, выделенному из глубоких горизонтов земной поверхности (клон B0477) и способному утилизировать моноароматические углеводороды, такие как салицилат и бензоат [8]. Еще несколько клонов или изолятов, одного вида с обнаруженными нами филоотипами *Sphingomonas*, были выявлены в холодных условиях Антарктики и Гренландии. Например, изолят *Sph. sp.* eh2 был получен из антарктических соляных наростов, где температура обычно колеблется от  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $0^{\circ}\text{C}$  [9]. Все это косвенно свидетельствует о психрофильных или психротолерантных свойствах вскрытых нами филоотипов *Sphingomonas*, что могло бы позволить им выживать в глубоких горизонтах скважины Восток при физиологических температурах *in situ* (от  $-10^{\circ}\text{C}$  до  $-6^{\circ}\text{C}$ ) и использовать алкилбензолы и полиароматические соединения в качестве источников углерода и энергии. Уже полученные данные по составу БЖ Восток (методом газовой хроматографии - масс спектрометрии) показали существенные концентрации толуена, ксилена, нафтадена, флуорена и фенантрена (Y. Jouanneau, личное сообщение). Однако, для подтверждения данной гипотезы требуется выделить два филоотипа *Sphingomonas* в культуру и изучить их свойства в лабораторных условиях, моделируя «природную» среду.

Следует отметить, что в контексте проведенного исследования все бактерии, найденные в образцах БЖ Восток, должны рассматриваться как контаминанты по отношению к образцам льда керна Восток. Однако, среди них мы можем выделить две функциональные таксономические группы, те, которые могут *in situ* метаболизировать компоненты БЖ и, вероятно, именно поэтому количественно доминирующие в структуре сообщества БЖ, и те, которые не могут метаболизировать компоненты БЖ и поэтому присутствующие там как «нерастущие» случайные контаминанты.

Два вскрытых нами в БЖ Восток фило типа *Sph. natatoria* and *Sph. sp.* были также обнаружены во льду других (различных) кернов глубокого бурения – Восток, Купол Тейлора (оба расположены в Антарктиде) и GISP2 (Гренландия). На основе собственных исследований и рассматривая соответствующие статьи, представляется очень вероятным, что эти образцы льда не были достаточно деконтаминированы для биологического анализа, что привело к тому, что на образцах льда остались следы БЖ. Полное удаление этой жидкости и, соответственно, ассоциированных с ней микробных контаминантов с образцов льда, предназначенных для молекулярно-биологического анализа, до сих пор представляет собой реальную проблему. Следовало бы использовать иные новые подходы, направленные не столько на удаление остатков БЖ с поверхности льда, сколько позволяющие сделать эту поверхность свободной от чужеродной ДНК.

В случае с нашим образцом озерного льда (3607 м) выявленный нами фило тип, идентифицированный как *Sph. natatoria*, был первоначально причислен к контаминантам на том основании, что его ближайшие родственники (в пределах вида) обладают способностями деградировать ароматические углеводороды [2]. Теперь мы подтвердили это, найдя этот же фило тип в БЖ Восток. Данный пример прямо указывает на необходимость создания микробной базы данных буровых жидкостей с целью верификации подлинности находок во льду.

Фило типы бактерий, ассоциированных с человеком или почвой, могли быть привнесены в БЖ во время транспортировки керосина на Восток и последующего хранения на станции в иных емкостях, а также в ходе формирования БЖ перед закачиванием в скважину. Это предположение подтверждается тем фактом, что два из трех ассоциированных с человеком фило типов были обнаружены в самом верхнем горизонте скважины (образец 110 м), который наиболее подвержен человеческой активности. Более того, этот образец был отобран внутри 120 м обсадочной трубы, что могло послужить дополнительным источником загрязнения.

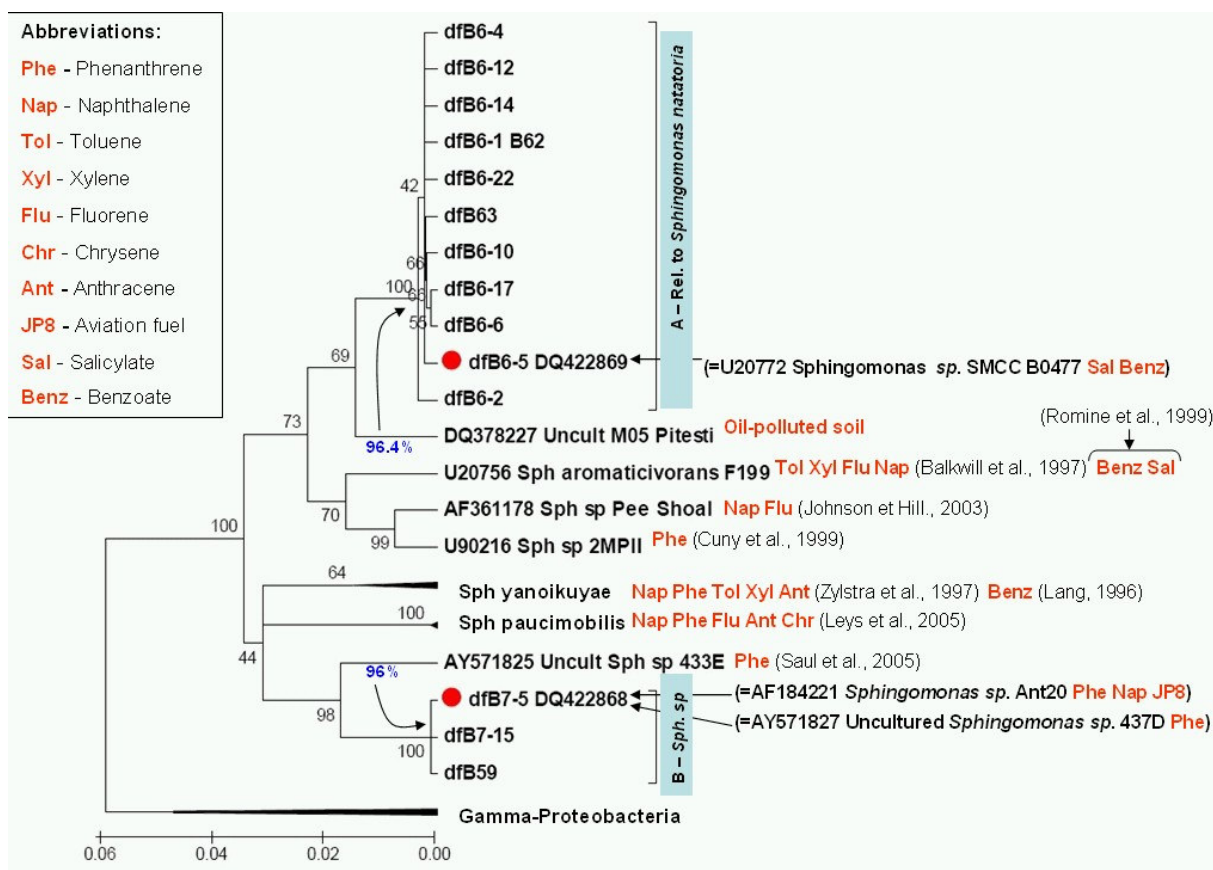


Рисунок 1. Филогенетическая реконструкция филоטיפов *Spingomonas*, вскрытых в БЖ Восток. Использованы метод Neighbor-Joining, 2-х параметровая модель Кимуры и 500 bootstrap повторений для получения статистической поддержки ветвления (значения указаны над ветвями). В целом проанализированы 403 однозначно выровненных сайтов для 25 таксонов, достоверно группирующихся с двумя филоטיפами *Spingomonas* из БЖ.

В заключение отметим, что проведенное исследование впервые показало, что БЖ Восток в нижних сравнительно теплых горизонтах глубокой скважины содержит доминирующие популяции (два вида) хемоорганотрофных бактерий рода *Spingomonas*, способных деградировать широкий спектр замещенных ароматических соединений и поэтому возможно метаболизирующих компоненты БЖ Восток *in situ*. Таким образом, можно предположить о существовании в Антарктиде новой антропогенной погребенной во льдах экстремальной эконишы, которая может создать экологические проблемы при изучении подледниковых антарктических водных систем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Priscu J.C., Kennicutt II M.C., Bell R.E. et al. Exploring subglacial antarctic lake environments // EOS, v.86, 2005. P 193, 197.
2. Bulat S.A., Alekhina I.A., Blot M. et al. DNA signature of thermophilic bacteria from the aged accretion ice of Lake Vostok, Antarctica: implications for searching for life in extreme icy environments // Int. J. Astrobiology, v.3, 2004. P 1-7.

3. Priscu J.C., Adams E.E., Lyons W.B. et al. Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica // *Science*, v.286, 1999. P 2141-2144.
4. Junge K., Eicken H., Swanson B. D., Deming J. W. Bacterial incorporation of leucine into protein down to -20°C with evidence for potential activity in sub-eutectic saline ice formations // *Cryobiology*, v.52, 2006. P 417-429.
5. The MEPAG Special Regions–Science Analysis Group Findings of the Mars Special Regions Science Analysis Group // *Astrobiology*, v.6, 2006. P 677-732.
6. Alekhina I.A., Marie D., Petit J.R. et al. Molecular analysis of bacterial diversity in kerosene-based drilling fluid from the deep ice borehole at Vostok, East Antarctica // *FEMS Microbiology Ecology*, v.59, 2007. P 289-299.
7. Saul D.J., Aislabie J.M., Brown C.E., Harris L., Foght J.M. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.53, 2005. P 141-155.
8. Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Drake G.R., Romine M.F., Ringelberg D.B., White D.C. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface // *Appl. Environ. Microbiol.* v.61, 1995. P 1917-1922.
9. Hughes K.A., Lawley B. A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts // *Environ. Microbiol.*, v.5, 2003. P 555-565.