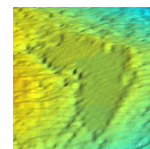


**СПРАВКА**  
**по комплексному биогеохимическому**  
**исследованию подледникового озера Восток**  
**(Антарктида) в ПИЯФ РАН**



г. Гатчина, август 2007 года



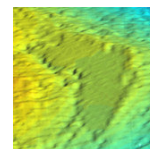
## **Подледниковое ОЗЕРО ВОСТОК (Антарктида) как объект комплексного биогеохимического исследования в ПИЯФ РАН**

### [Популярное изложение настоящего положения дел](#)

Подледниковые антарктические озера в настоящее время рассматриваются в качестве уникальных Земных аналогов ледовых условий, существующих, например, на полюсах Марса или луне Юпитера Европа, и поэтому возможность обнаружения в таких средах микробную жизнь привлекает особое внимание. До настоящего времени методами дистанционного зондирования в Антарктиде уже выявлено более 145 подледниковых озер и водных резервуаров.

Именно изучение подледниковых антарктических озер является одной из пяти приоритетных программ Международного Полярного Года (март 2007 – март 2009) (МПГ) - широкомасштабной международной программы полярных исследований. Проведение МПГ приурочено к 125-летию первого Международного полярного года (1882-1883 гг.), 75-летию второго МПГ (1932-1933 гг.) и к 50-летию третьего (1957-1958 гг.), получившего название Международного геофизического года (МГГ).

Из подледниковых антарктических озер наиболее известным и изученным является крупнейшее озеро Восток, расположенное под российской станцией Восток. Еще до открытия озера на станции Восток было начато глубокое бурение для изучения палеоклимата на основе информации, содержащейся в древнем льду ледника: данные по газовому и изотопному, а также химическому (и частицы пыли) составу и содержанию на протяжении 4-х последних циклов оледенения-потепления Земли. После открытия озера особый научный интерес вызвали биологические исследования. По оценкам специалистов озеро изолировано от поверхностной биоты на протяжении минимум 15 млн. лет, и поэтому поиск микробной жизни в озере, ее эволюция (адаптация)

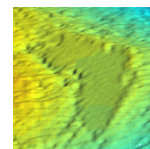


в необычных (экстремальных для жизни) условиях привлекают пристальное внимание ученых и общественности. В числе прочих условий отметим полное отсутствие света, высокое давление, низкую температуру (около точки замерзания), крайне низкое содержание органических веществ и вероятный сверх избыток растворенного кислорода.

В течение 1990-1998 гг. проект «Восток» был трехсторонним при участии ученых США, Франции и России. С 2005 г. глубокое бурение на станции Восток является национальным проектом России, однако, многие исследования, в том числе и биологические, идут в тесном сотрудничестве с французскими коллегами.

Сейчас глубина скважины достигла глубины 3663.41 м. Это значит, что в руках исследователей находится более трех с половиной километров льда в виде цилиндра (керн) диаметром около 10 см. Большую часть этого льда (до глубины 3539 м) представляет атмосферный лед, т.е. осадки в виде снега в Центральной Антарктиде за последние 1-2 млн. лет. Однако с глубины 3539 м лед оказался отличным как по газовому и изотопному составу, так и структуре кристаллов от верхнего атмосферного льда. Было показано, что это есть так называемый озерный (аккреационный) лед, представляющий собой воду озера, намерзшую на подошву ледника. Сейчас, когда еще нет доступа к (незамерзшей) воде, этот лед представляет собой единственный материал, позволяющий изучать озеро Восток. До воды озера остается слой льда около 85 м, и в ближайшие годы мы будем свидетелями проникновения в этот самый таинственный водоем на нашей планете.

Озерный лед в связи с его происхождением и составом делят на два типа. Первый (верхний) тип льда содержит видимые глазом включения минеральных осадков размером до 1.5 см и по расчетам гляциологов образуется в прибрежной черте озера. Второй тип льда (начиная с отметки 3609 м и глубже) образуется над глубокой частью озера и является абсолютно чистым. Кроме того, этот лед состоит из удивительно больших по размеру кристаллов – 20-50 см, а иногда и до 1 м. Гигантский размер кристаллов объясняют условиями формирования и «эволюции» этого льда. Так, замерзание воды происходит при очень малой скорости (менее 10



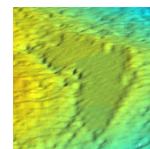
мм в год) под высоким давлением (около 400 атм.) с последующей перекристаллизацией льда.

Наша группа была привлечена к исследованиям озера Восток в 1999 г, и основной задачей было оценить, есть ли микробы (и какие) во льду озера, погребенного под 4-км Восточно-Антарктическим ледовым щитом. Конечной целью исследования было обнаружение и характеристика микробной жизни в экстремальных подледниковых условиях существования.

Несмотря на то, что присутствие микробных клеток во льду озера Восток было уже заявлено американцами в 1999 г. (они, как и французы получили по 1/3 озерного льда в рамках трехстороннего сотрудничества), большая вероятность загрязнения образцов чужеродными бактериями требует особых мер предосторожностей при проведении анализов и интерпретации результатов. Отметим, что лед бурился не для биологических исследований, и поэтому большую и до конца не решенную проблему представляет его правильная деконтаминация, включая полное удаление жидкости для бурения, состоящей из смеси керосина и фреона, которая сама по себе представляет питательную среду для существования микроорганизмов. Деконтаминация, т.е. удаление всех привнесенных извне организмов или их ДНК, является одной из критических стадий, от которой зависит конечный результат исследований.

Основными методами нашего исследования являются методы молекулярной филогенетики, в частности, ДНК-анализ генов малой субъединицы рибосомной РНК бактерий и археобактерий с соблюдением правил работы с «древней» ДНК, где также велика вероятность загрязнения чужеродной ДНК. На практике это выглядит как судебная микробиология, когда по «отпечатку» ДНК идентифицируют вид микроба. Согласно данным химического анализа и анализа льда на содержание пыли известно, что антарктический лед (особенно до появления там человека) очень чистый, и его обработка и последующие анализы требует соблюдения определенных условий. К таким условиям относится необыкновенная чистота всего, с чем соприкасается лед и где он обрабатывается. Так, процедуры обработки и анализа проводят в специальных строго изолированных несколькими шлюзами чистых

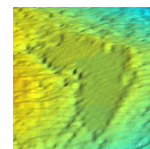




комнатах класса как минимум 10000 с установленными внутри ламинарными кабинетами класса 100. Современное аналитическое химическое оборудование настолько чувствительно, что прибор «различает» в чем вы одеты - в чистую специальную (часто разовую) одежду или в том, в чем сидите в офисе или ходите по улице. Не меньшее значение имеет и вода, которой обмывают лед. Цикл очистки воды, пригодной для работы со льдом, состоит из несколько этапов. В итоге получают такую ультрачистую воду (система ELGA Maxima), по сравнению с которой дважды дистиллированная вода выглядит как слабо минерализованная вода.

Что же мы нашли в озерном льду по настоящее время? Во льду, который пока еще далек от воды и по расстоянию (около 85 м) и по возрасту (минимум 15 тыс. лет). Говоря в целом, мы не смогли подтвердить ни то количество микроорганизмов, ни те виды, которые заявили американцы в двух своих публикациях в журнале Science в 1999 г. По нашим данным лед Центральной Антарктиды (как озерный, так и атмосферный) настолько чист, что практически не содержит микробных клеток. Особенно чист озерный лед второго типа. Большинство найденных нами по ДНК микроорганизмов (и виды, идентифицированные американцами) относятся к контаминантам, т.е. посторонней микрофлоре, которая случайно попадает в образцы при их отборе, обработке или анализе.

Следует еще раз отметить, что сверхчистые образцы требуют сверхчистых условий для анализа. Так, мы работаем с ДНК, а все расходные материалы и изделия из пластика – пробирки, наконечники для пипеток, а также реактивы для молекулярной биологии обычно не проверяются и не сертифицируются на отсутствие посторонней ДНК. Лишь недавно некоторые компании стали проверять свои изделия на загрязнение чужеродной человеческой ДНК, что особо актуально для судебной медицины. В то же время бактерии окружают нас повсюду, живут с нами и в нас, так что создать условия и работать так, чтобы полностью исключить постороннюю микрофлору или ее ДНК, практически невозможно. Путем поиска мы отобрали самые чистые и надежные реактивы, выбрали производителей наиболее чистого пластика, который тем не менее мы сами дополнительно обрабатываем –

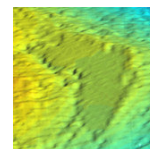


удаляем микробы и разрушаем ДНК высокими дозами  $\gamma$ -радиации или озонированием. Были разработаны специальные протоколы обработки льда в холодных камерах для полного удаления пленки керосина/фреона, особые протоколы обработки льда в чистой комнате непосредственно перед плавлением, протоколы концентрирования водных растворов и выделения геномной ДНК. При соблюдении всех требований чистой работы мы получаем концентрации клеток во льду в тысячи раз меньше, чем было заявлено ранее или мы сами получали до начала чистой работы. Это и подтверждает всю важность тщательной деконтаминации образцов льда и чистой работы с ним.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований было выявлено лишь несколько видов бактерий, которые все были обнаружены только в образцах озерного льда типа 1 (с минеральными включениями). Наиболее глубокие и древнейшие слои атмосферного льда (возрастом до 2 млн. лет), располагающиеся прямо над озером, не дали никакого достоверного сигнала. Это означает, что древний атмосферный лед служит своеобразным барьером между экосистемой озера и поверхностной биотой на протяжении по меньшей мере 15 млн. лет.

Среди находок в озерном льду единственной достоверной находкой (не вызывающая никаких сомнений в том, что не контаминант) оказалась термофильная и хемоавтотрофная бактерия. Впервые эта бактерия была нами обнаружена в образце льда с глубины 3607 м, но в последующем была подтверждена в другом образце этого же льда (3561 м). Интересно, что данные горизонты разделены между собой слоем льда толщиной 47 м и возрастом около 5 тыс. лет.

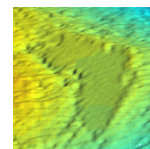
Конечно же, эти термофильные бактерии, не могут обитать в самой воде озера (средняя температура  $-2.65^{\circ}\text{C}$ ). Было предположено, что они могут жить в относительно теплых ( $40^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$ ) анаэробных осадочных породах богатых диоксидом углерода и водородом в глубоких (на глубине 2-3 км) разломах на дне или окрестностях озера и выбрасываться в мелководный залив озера (где образуется озерный лед 1-го типа) в результате сейсмотектонической активности, периодически происходящей в



районе озера Восток. Существует несколько геологических и геофизических подтверждений такого сценария. Хочется отметить, что находка термофильных бактерий в озерном льду дала импульс для пересмотра целого ряда геологических и геофизических параметров озера Восток, что сделало его наиболее полно изученным из всех подледниковых озер Антарктиды и, тем самым, наиболее желанной мишенью для проникновения. Вопрос о жизни в озере Восток остается до сих пор открытым (ПРИЛОЖЕНИЕ 1).

На основании уже полученных результатов можно сделать предположение, что озеро Восток может быть единственной в своем роде сверхчистой (если лед адекватно представляет воду) гигантской водной системой на нашей планете Земля и, тем самым, служить уникальным полигоном для отработки методов поиска жизни на ледовых планетах и лунах. Если там существуют подледниковые водоемы, то они должны быть сходны с озером Восток по крайней мере по ряду свойств: находится глубоко подо льдом, быть подверженными высокому давлению и близким к точке плавления (пригодным для жизни) температурам, быть длительно изолированными от поверхностной среды, быть олиготрофными по органическому углероду и содержать очень низкую биомассу.

Дальнейшие поиски жизни в озере Восток предполагают исследование новых образцов озерного льда, более молодого и находящегося ближе к воде озера, далее, при проникновении в озеро – изучение различных горизонтов водной колонки, и в заключение – изучение осадочных пород озера, которые в отличие ото льда и воды наиболее вероятно содержат микробную жизнь.



## [Строгое изложение настоящего положения дел с ссылками на ключевые опубликованные работы](#)

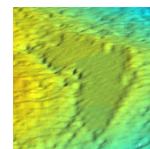
Подледниковые антарктические озера в настоящее время рассматриваются в качестве уникальных Земных аналогов ледовых условий, вероятно существующих на полюсах Марса или спутниках Юпитера (Европа) или Сатурна (Энцеладус), и поэтому возможность таких сред содержать микробную жизнь привлекает особое внимание. Именно изучение Антарктических подледниковых озер является одной из пяти приоритетных программ Международного полярного года. Несмотря на то, что присутствие микробных клеток в озере Восток, Восточная Антарктида, было уже заявлено в результате изучения озерного льда, т.е. замерзшей воды озера [1, 2], большая вероятность «прямого» загрязнения образцов чужеродной микрофлорой требует особых предосторожностей при интерпретации полученных результатов [3, 4].

Задачей нашего исследования было оценить микробное содержание в озерном льду озера Восток, погребенном под 4-километровым Восточно-антарктическим ледовым панцирем [5]. Конечной целью исследования является обнаружение и характеристика микробной жизни в этих экстремальных ледовых условиях, которые характеризуются изоляцией от поверхностной окружающей среды в течение как минимум 15 млн. лет, отсутствием света, высоким давлением (около 400 атм.), низкой температурой (около точки замерзания), крайне низким содержанием органических веществ и вероятным сверх избытком растворенного кислорода.

Основными методами исследования были методы молекулярной филогенетики, в частности секвенирование (ДНК-анализ) генов малой субъединицы рибосомной РНК бактерий и археобактерий с соблюдением критериев изучения и установления подлинности «древней» ДНК [6]. Оценку количества клеток осуществляли проточной цитофлуориметрией.

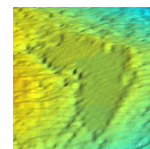
Озерный лед, полученный при глубоком бурении во льду на станции Восток [7], на сегодняшний день представляет единственную и уникальную в своем роде возможность для поиска





жизни в подледниковых озерах Антарктики. Вместе с тем, отметим, что этот лед бурился не для биологии, и поэтому большую и до конца не решенную проблему представляет его правильная биодеконтаминация [4], включая полное удаление жидкости для бурения, которая сама по себе представляет среду, пригодную для существования микроорганизмов [8].

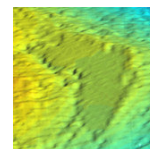
Возраст озерного льда оценивается максимум в 20 тыс. лет [9]. Этот лед состоит из двух слоев. Верхний слой, так называемый 1-ый тип льда, содержит мелкие (микронного размера) включения глинисто-слюдяных осадков и, как полагают, образуется над мелководным заливом, расположенным по линии тока льда по направлению к ст. Восток. Нижний, 2-ой тип льда, не содержит никаких частиц (очень чистый) и образуется над глубоководной частью озера. Оба типа льда практически не содержат воздуха (газовое содержание на 2-3 порядка меньше, чем в атмосферном льду - леднике), в нем не обнаружено кислорода, а также метана и сульфида водорода, хотя отмечено незначительное обогащение диоксидом углерода, что явно указывает на анаэробные условия. Для этого льда характерно крайне низкое содержание растворенного углерода (менее 10 ppbC), что говорит об ультраолиготрофных условиях. Окисленные соединения азота (нитраты, нитриты) не выявлены, а восстановленные (аммоний), если и выявляются, то представляют источник загрязнения. Особенностью льда 1-го типа является присутствие в нем как окисленных (в основном), так и восстановленных (в виде металл-сульфидов) соединений серы, а также обогащение магнием и кальцием. Присутствие «вездесущего» водорода пока только предсказано и будет количественно измерено в ближайшее время. Температура всего слоя озерного льда не превышает  $-7^{\circ}\text{C}$ , что находится в пределах так называемой физиологической температуры, при которой экспериментально показан факт метаболической активности бактерий [8]. Таким образом, возможные редокс-пары, которые могут поддерживать хемолитоавтотрофную жизнь (а иная невозможна при данных условиях), ограничены водородом, как единственно возможным восстановителем, и с другой стороны - сульфатами и диоксидом углерода как акцепторами электронов и источником углерода.



Такие знания об озерном льде и возможные предсказания для воды озера (при условии, что озерный лед действительно представляет воду озера) позволили сделать следующие предположения о возможных формах микробной жизни в озере. Так, независимо от того, где могут «жить» бактерии - непосредственно во льду (и, именно, во льду 1-го типа с минеральными включениями) или воде озера, следует ожидать встретить хемоавтотрофные пьезофильные психрофилы. Отличие льда от воды в плане условий, важных для жизни, заключается только в содержании кислорода. В озерном льду бактерии должны быть анаэробными, тогда как в воде озера - «оксигенофильными» (науке пока неизвестны) или аэробными (зависит от пока неизученного гидрологического режима озера Восток, которое может быть связано с другими озерами в единую сеть с периодическими сбросами воды [10]). Однако в обоих случаях микроорганизмы должны быть хемоавтотрофами по способу получения энергии и психрофильными и пьезофильными по физиологии.

Проведенные исследования образцов озерного льда методами ДНК анализа показали, что этот лед в целом является исключительно чистым, не содержащим ни бактериальную, ни археобактеральную ДНК. До настоящего времени лишь несколько бактериальных фило типов были вскрыты в образцах озерного льда 1-го типа, содержащего глинисто-слякучие включения. В то же время тщательный со всеми предосторожностями в плане контаминации анализ более глубокого, молодого и чистого озерного льда 2-го типа не дал никаких достоверных находок. Следует также отметить, что в наиболее глубоких и древнейших горизонтах атмосферного льда (возрастом до 2 млн. лет), располагающегося прямо над поверхностью озера, также не была обнаружена микробная ДНК [3]. Таким образом, глубокий и древний атмосферный лед служит своеобразным барьером между экосистемой озера и поверхностной биотой на протяжении по меньшей мере 15 млн. лет.

Среди находок в озерном льду 1-го типа отметим единственный организм, надежно идентифицированный по ДНК-сигналу, который оказался истинной термофильной и

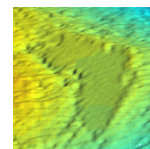


хемоавтотрофной бактерией *Hydrogenophilus thermoluteolus* [3]. Впервые эта бактерия была обнаружена в образце льда с глубины 3607 м [3], но в последующем была подтверждена в другом горизонте льда 1-го типа (3561 м) [11]. Интересно, что данные горизонты разделены между собой слоем льда толщиной 47 м и возрастом около 5 тыс. лет.

Термофильные бактерии, обнаруженные по ДНК-отпечаткам в озерном льду 1-го типа, по всей видимости, обитают не в самой воде озера (температура  $-2^{\circ}\text{C}$  -  $-3^{\circ}\text{C}$ ), а в его основании [3]. Было предположено, что они могут жить в относительно теплых ( $40^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$  на глубине 2-3 км) анаэробных осадочных породах богатых диоксидом углерода и водородом в глубоких разломах на дне или окрестностях озера и выбрасываться/выноситься в мелководный залив озера (где образуется озерный лед 1-го типа) в результате сейсмотектонической активности, периодически происходящей в районе озера Восток [12]. Существует несколько геологических и геофизических подтверждений такого сценария [3, 9]. Следует подчеркнуть, что находка термофильных бактерий в озерном льду дала импульс для пересмотра целого ряда геологических и геофизических параметров озера Восток, что сделало его наиболее полно изученным из всех подледниковых озер Антарктиды и, тем самым, наиболее желанной мишенью для проникновения.

Имея в виду окислительно-восстановительные реакции, возможные в озерном льду 1-го типа, было предпринято специальное исследование с целью обнаружения ДНК-отпечатков двух других групп хемоавтотрофов, которые могли бы существовать в данных условиях, а именно метаногенных архебактерий и сульфат-редуцирующих бактерий. Однако, ни ПЦР с праймерами, специфичными для архебактерий, ни тщательный анализ рДНК клоновых библиотек на присутствие сульфат-редуцирующих бактерий, не дали результатов. Отметим, что это полностью согласуется с данными по газовому содержанию в озерном льду 1-го типа – отсутствию метана и сульфида водорода. Таким образом, вопрос о жизни в озере Восток остается до сих пор открытым.

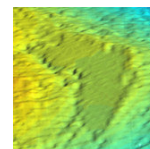
Результаты ДНК анализа озерного льда были подтверждены прямыми методами флуоресцентной и лазерной конфокальной



микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и проточной флуориметрии. Все методы микроскопии не позволили обнаружить микробные клетки в тщательно деконтаминированном озерном льду. Лишь метод проточной цитофлуориметрии позволил определить концентрации клеток в концентрированных образцах воды в пределах 0.6-9 клеток на мл воды для озерного льда обоих типов. Полученный результат, который оказался на 2-3 порядка ниже, чем ранее опубликованные данные [1, 2], свидетельствует о крайне низкой биомассе во льду, образованном из воды озера Восток, и подчеркивает важность строгой деконтаминации образцов льда [3].

Подводя итоги, отметим, что озерный лед 1-го типа характеризуется очень малой и неравномерно распределенной биомассой, которая может и не иметь прямого отношения к воде озера. Это косвенно свидетельствует о том, что и водный столб (по крайней мере, его поверхностный слой) должен характеризоваться очень бедной микробной жизнью, если таковая там вообще существует, ибо из идентифицированных находок аутентичной (для льда) пока остается одна – хемолитоавтотрофная термофильная бактерия.

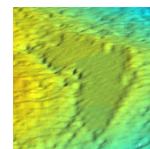
Таким образом, еще раз подчеркнем, что вопрос о существовании жизни в озере Восток остается пока открытым (ПРИЛОЖЕНИЕ 1). На основании уже полученных результатов можно сделать предположение, что озеро Восток может быть единственной в своем роде сверхчистой (почти стерильной) гигантской водной системой на нашей планете Земля (бактериальной планете) и, тем самым, служить уникальной экспериментальной площадкой для отработки методов поиска жизни за пределами Земли на ледовых планетах и лунах. Дальнейшее изучение этого вопроса (о существовании жизни в озере Восток) предполагает исследование новых образцов озерного льда, находящегося намного ближе к открытой воде озера, далее, при проникновении в озеро – изучение различных горизонтов водного столба, и в заключение – изучение осадочных пород озера, которые в отличие ото льда и воды наиболее вероятно содержат микробную жизнь.



## ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Karl D.M., Bird D.F., Bjorkman K. et al. Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica // *Science*, v.286, 1999. P 2144-2147.
3. 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.
4. Priscu J.C., Kennicutt II M.C., Bell R.E. et al. Exploring subglacial antarctic lake environments // *EOS*, v.86, 2005. P 193, 197.
5. Kapitsa A.P., Ridley J.K., Robin G. de Q. et al. A large deep freshwater lake beneath the ice of central East Antarctica // *Nature*, v.381, 1996. P 684-686.
6. Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA // *Proc. R. Soc. B*, v.272, 2005. P 3-16.
7. Jouzel J., Petit J.R., Souchez R. et al. More than 200 meters of lake ice above subglacial Lake Vostok, Antarctica // *Science*, v.286, 1999. P 2138-2141.
8. 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.
9. Petit J.R., Alekhina I., Bulat S. Lake Vostok, Antarctica: Exploring a subglacial lake and searching for life in an extreme environment // *Lectures in Astrobiology*. Berlin: Springer, v.I, 2005. P 227-288.
10. Wingham D.J., Siegert M.J., Shepherd A. et al. Rapid discharge connects Antarctic subglacial lakes // *Nature*, v.440, 2006. P 1033-1036.
11. Lavire C., Normand P., Alekhina I. et al. Presence of *Hydrogenophilus thermoluteolus* DNA in accretion ice in the subglacial Lake Vostok, Antarctica, assessed using *rrs*, *cbb* and *hox* // *Environ. Microbiol.*, v.8, 2006. P 2106-2114.
12. Studinger M., Bell R.E., Karner G.D. et al. Ice cover, landscape setting, and geological framework of Lake Vostok, East Antarctica // *Earth Planet. Sci. Lett.*, v.205, 2003. P 195-210.





## НОВЫЙ ПРОЕКТ – Физикохимия и биология озера Восток

### Название проекта

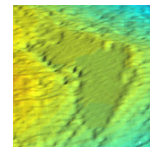
**Комплексное [физико-биогеохимическое] исследование подледникового ОЗЕРА ВОСТОК (воды и осадочных пород) в Антарктиде как единственного земного аналога внеземных ледовых сред**

### Чего мы хотим?

- *Минимум* **Программу РАН** – между Физическим и Биологическим отделениями
- *Максимум* **Совместную программу РАН и Росгидромета** (Федеральной службы России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды)

### Структура-участники

- **РАН**
  - ПИЯФ - Петербургский Институт Ядерной Физики им. Б.П. Константинова (Физическое отделение РАН) – головная организация
  - Институты-соисполнители Биологического отделения РАН (секция физико-химической биологии):
    - Ин-т Микробиологии им. Виноградского – директор чл.-корр. В.Ф. Гальченко
    - Ин-т Медико-Биологических Проблем – директор акад. А.И. Григорьев
    - ??? (в стадии обсуждения)
- **Росгидромет**
  - ААНИИ (ГУ "Арктический и Антарктический Научно-Исследовательский Институт") – директор д.г.н. И.Е. Фролов
  - РАЭ (Российская Антарктическая Экспедиция) - начальник В.В. Лукин, заместитель директора ААНИИ

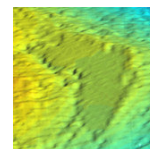


## Что в программе?

- Комплексное (физико-биогеохимическое) изучение подледникового озера Восток (водной колонки и осадочных пород) методами биофизики и молекулярной биологии и филогенетики.
- Главная цель - обнаружение и филогенетическая характеристика форм жизни, если она существует в озере.
  - Сопутствующая цель – разработка инструментария и подходов для поиска и верификации форм внеземной жизни на ледовых планетах и лунах.
- **Разработка и изготовление (био)физического инструментария**
  - **Устройства для биодеконтаминации** (с использованием как в ПИЯФ РАН, так и на станции Восток)
    - гамма-облучатели ( $Co^{60}$ ) – в том числе проточные (для жидкости для бурения)
    - озонаторы (коронный разряд) - деконтаминация зондов, пробоотборников и пр.
  - **Датчики-сенсоры** (сколько и какие - в стадии обсуждения)
    - Физико-химические параметры среды
    - Биомаркеры (биоиндикация – есть ли следы жизни и, если есть, то какие)

Например, проект предусматривает создание многоканального флуориметра для *in-situ* исследования, способного регистрировать флуоресценцию в диапазоне длин волн от 330 до 550 нм при возбуждении, как в ультрафиолетовом, так и в видимом диапазоне. Метод отличается высокой чувствительностью, простотой и надежностью и позволяет регистрировать наличие в толще льда триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатков - составляющих белков, а также NADH, полициклических ароматических углеводов, кофермента F420 (характерного для метаногенных археобактерий) и других соединений, присутствующих в живых организмах. В условиях крайне низкого фонового освещения и отсутствия микро (частиц) вулканических и осадочных пород, подобный подход позволит получить информацию о наличии флуоресцентных биомаркеров даже если они присутствуют в крайне низкой концентрации. Так, современный уровень развития техники позволяет регистрацию автофлуоресценции бактерий в концентрации до 1 клетки на см<sup>3</sup>.

- **Зонд (гидробот)** с соответствующим набором инструментов/датчиков для исследования воды и осадков озера. Прибор должен быть введен в озеро



через скважину для бурения. В качестве прототипа будет использована соответствующая разработка NASA (USA) для изучения подледникового озера Ellsworth (см. схему Antarctica Probe)

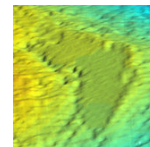
- **Метагеномика (молекулярная биология-филогенетика) жизни в воде и осадках озера**
  - Устройства для биодеконтаминации
    - гамма-облучатели ( $Co^{60}$ )
    - озонаторы (коронный разряд)
  - Холодные ( $-15^{\circ}C$ ) чистые (европейский класс 1000-10000) комнаты для работы со льдом
  - Чистые комнаты (класс 1000-10000) для работы с водой
  - Ламинары и ПЦР боксы класса 10-100 для работы с водой и ДНК, соответственно
  - Установка для производства на месте ультрачистой воды для лабораторного использования (фильтрация через 5000 Da; содержание органического углерода менее 2 ppbC) с использованием менее чистой воды (две последовательно связанные системы)
  - Специальный биологический инструментарий (синтез праймеров, секвенирование ДНК, иммунофлуоресцентная твердофазная цитометрия, спектрофлуориметрия)
  - Специальные наборы для работы с ДНК любых форм организмов (например, технология WGA) и другими биомолекулами (аминокислоты, липиды, хопаны и пр.)

### Требуемое финансирование

В стадии обсуждения

### Контакты:

<b>В.М. Самсонов</b> Д.ф.-м.н., профессор Директор ПИЯФ РАН Tel.: +7-813 71-36037, -46017 Fax: +7-813 71-36025 E-mail: <a href="mailto:samsonov@pnpi.spb.ru">samsonov@pnpi.spb.ru</a>	<b>С.А. Булат</b> К.б.н., ст.н.с. Отдел Молекулярной и Радиационной Биофизики, ПИЯФ РАН Tel.: +7-813 71-46625 Fax: +7-813 71-32303 E-mail: <a href="mailto:bulat@omrb.pnpi.spb.ru">bulat@omrb.pnpi.spb.ru</a>
--	--

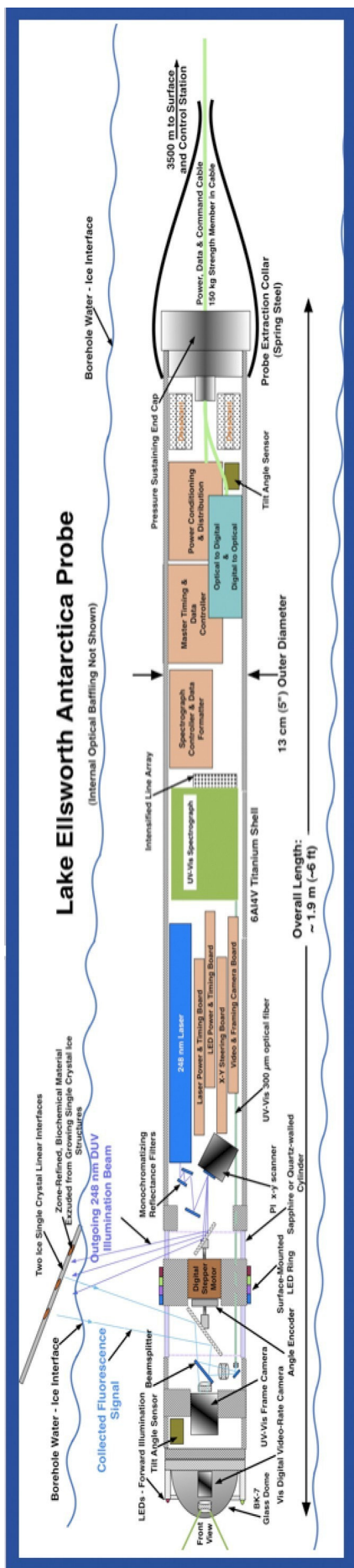


## Development of an In-situ Capability for an Astrobiology Investigation of Antarctica's Lake Ellsworth – A Truly Hostile, Extreme Environment

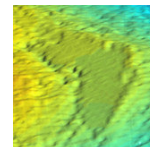
Principal Investigator: Dr. Arthur Lonne Lane, S. 3226  
Co-Is: A.Behar (347), R.Bhartia (322), P.Conrad (322), C.Mogensen (384),  
F.Carsey (384,Ret.), M.Pelletier (384, now Pfizer), L.French (322-IEP)

**Poster No. 06 - 089**

Схема зонда, включающего функции прямого и бокового (360°) осмотров в реальном времени, направленной УФ флуоресценции и защиты от давления до (океанической) глубины 9000 м с коэффициентом безопасности 1.5.







## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Современное состояние дел в данной области исследований по материалам научной печати - 7 июля 2007 г., журнал *Science*, 2007, 317, с. 35-36

NEWSFOCUS

MICROBIAL ECOLOGY

### The Dark and Mushy Side of A Frozen Continent

Researchers are uncovering a wetter world under the Antarctic ice than they ever imagined. But it's far from clear which life forms call this extreme environment home

**BIG SKY, MONTANA**—Wetlands might seem incongruous in Antarctica's frozen wastes. But recent expeditions have uncovered a hidden landscape of lakes, marshes, and apparent rivers sandwiched between ice and rock. These vast wetlands, imprisoned under the ice, may even be teeming with life.

"There's water everywhere under there," says John Priscu, a microbiologist at Montana State University in Bozeman. At a meeting\* here last month, Priscu and other experts compared notes on the latest tantalizing clues to what this unparalleled and largely unplumbed world might be like—and laid plans for exploring it.

The first big plunge is likely to occur in Lake Vostok, the largest of Antarctica's 150-and-counting hidden lakes. A Russian-led team is preparing to penetrate and sample Vostok in 2009. The operation may help settle a point of sharp scientific dispute: whether the Connecticut-sized lake, overlain by more than 3.5 kilometers of ice, harbors microbial life. "We never thought life could exist down there," Priscu says. Now he's a believer. Other researchers are skeptics.

But experts concur that there's far more to Antarctica than meets the eye. "We're seeing a wide range of subglacial environments, from Lake Vostok to shallow, swampy environments," says Peter Doran, an earth scientist at the University of Illinois at Chicago. For now, the startling wetlands are terra incognita. Robin Bell, a geophysicist at Columbia University, says, "we've got a long way to go" before comprehending what's going on under the ice.

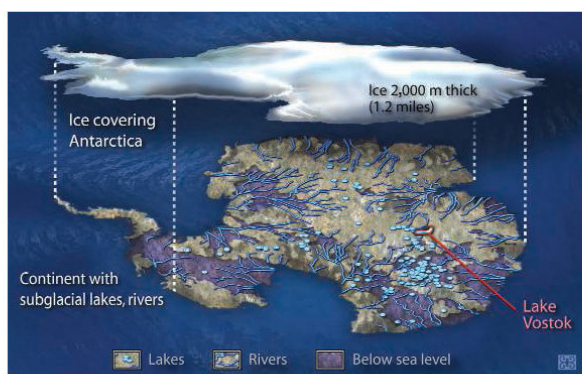
#### Peeking under the cover

The revelations about Antarctica's soggy, pitch-black underbelly have come mainly from drilling campaigns and radar mapping

\* Subglacial Antarctic Lake Environments, 6–8 June.

over the past decade. Drills that have bottomed out below the ice sheet have often hit water or warm, soft ice.

The ice blanketing the continent traps heat radiating up from Earth's core. That warmth, combined with intense pressure from the ice bearing down, allows water pockets under the sheet to keep their liquid form at normally freezing temperatures. All told, Antarctica's subglacial lakes contain around 10,000 cubic kilometers of water—about 10% of the fresh water in all the lakes elsewhere on Earth.



Water, water everywhere. An artist's rendition of aquatic Antarctica.

Antarctica's frigid water world is more dynamic than expected. Two recent studies found that some smaller subglacial lakes can roam around—they burst their banks and fill lower-elevation depressions. These findings hint at the existence of transient rivers, some as large, perhaps, as England's Thames—and raise the stakes on attempts to tap into the lakes. "We have to take a watershed approach," Doran says. If pollutants infiltrate a watershed, he says, "we may be contaminating things all the way downstream."

Although no subglacial lake has yet been pricked, researchers have drilled to within about 90 meters of Vostok's surface. Ice from this nether region is illuminating. When drilled down into from about 240 meters above the lake, the core changes from glacial ice, composed of compacted snow, to accretion ice, formed when Vostok water freezes to

the ice sheet. Researchers have reported that accretion ice contains microbes that could be revived in the lab. Many scientists infer that these microbes were Vostok denizens, and other studies have shown that the microbes are close relatives of those found from Greenland to the Himalayas.

There are other signs of vitality as well. The sole sediment core under the ice sheet tested so far for microbes is brimming with life. In 2004, Brian Lanoil of the University of California, Riverside, and colleagues found that sodden soil under the Kamb Ice Stream in West Antarctica contained 10 million cells per gram—comparable to that of lake sediments found in temperate regions, and similar to sediments found under glaciers in New Zealand and Norway.

Glacial ice from the Vostok core is studied with modest numbers of microbes, around 100 cells per milliliter, according to studies led by Priscu and Brent Christner, a microbiologist at Louisiana State University in Baton Rouge. At the glacial-accretion ice transition, they reported last year in *Limnology and Oceanography*, the number rises to around 400 cells per milliliter. Accretion ice is also rich in organic carbon, Christner says. "This suggests that the lake is a source of both cells and organic carbon."

Other researchers think that the ice—and perhaps Vostok's waters—is largely sterile. Sergey Bulat, a molecular biologist at the Petersburg Nuclear Physics Institute (PNPI) in Russia, and his colleagues have also been probing the Vostok core for microbes and DNA. At the meeting, Bulat reported that his team often finds no cells in samples from both glacial and accretion ice, and never more than 20 cells per milliliter. (Bulat does put stock in one sign of life: His group has found that accretion ice contains DNA of bacteria similar to thermophilic species in vents on the ocean floor. Such microbes, he says, could be clinging to rocks around Vostok Lake and in lake sediments.)

The discrepancy between the Russian and U.S. cell counts could be due to different sampling techniques, says microbial ecologist Warwick Vincent of Laval University in Quebec, Canada. Whereas Bulat's team uses flow cytometry, Priscu and Christner count cells under a light microscope or scanning electron microscope. Or, says Vincent, "it could be that

Downloaded from www.sciencemag.org on July 7, 2007

CREDIT: ZINA DERETSKY/NSF



there's a lot of heterogeneity in the ice core." Others argue that Prisco and colleagues have been led astray by an artifact. To keep the Vostok borehole from freezing shut, it's filled with drilling fluid. The hydrocarbons are a feast for bacteria. Says Christner: "We can think of the borehole as a 65-ton enrichment culture."

Inna Alekhina and her colleagues at the PNPI found that some microbes in the drilling fluid match species that Christner and others have found inside cores from Vostok and from the Taylor Glacier in Antarctica—microbes that they argued were native to the ice. The primary bacteria in the drilling fluid were *Sphingomonas* species, known contaminants of jet fuel—like the drilling fluid, mostly kerosene. "There is no indication for indigenous microbes," Alekhina concludes.

Prisco rebuts this by pointing to a study in

Antarctica's McMurdo Dry Valleys in which his group found hydrocarbon-eating microbes. "The organisms are there in nature," Prisco says. "Just because we see it in the drilling fluid doesn't mean it's not native."

That debate notwithstanding, it's a mystery how microbes can survive deep in the Vostok core, which near the bottom could be 1 million to 2 million years old. If the cells had remained frozen all that time, "their genomes would accumulate enough damage that they would effectively be dead," Christner says. One microbial refuge might be the water channels between the ice crystals, says Buford Price, a physicist at the University of California, Berkeley. Christner and biophysicist James Raymond of the University of Nevada, Las Vegas, are testing whether the microbes are specially adapted to the cold

life. Raymond found that one *Chryseobacterium* species from the Vostok core produces a protein that, in the lab, blocks ice-crystal growth. This suggests the bacteria are reshaping the ice around them to minimize damage, says Christner. The protein might work as antifreeze or as a seed for crystal formation to form an ice cocoon around the bacteria.

"This debate will not be resolved until Lake Vostok is sampled directly," says Vincent. When Russia breaks through, it will be like exploring a different planet. The drilling that has preceded this adventure has been "like putting pinholes in the continent," Prisco says. "We don't know what's on the bottom of that ice sheet." Well, we do know one thing: It's wet.

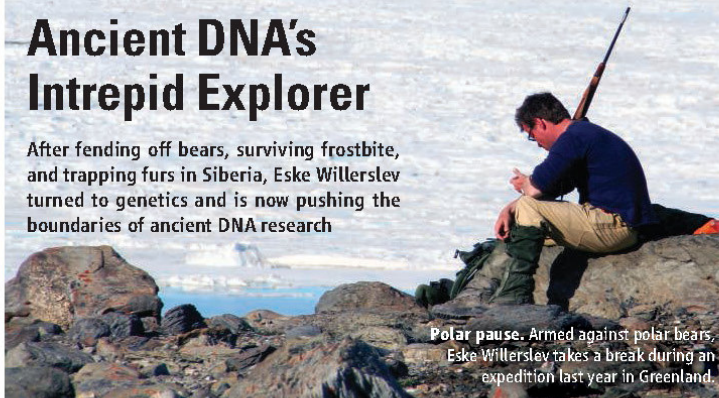
—MASON INMAN

Mason Inman is a freelance journalist in Cambridge, Massachusetts.

PROFILE: ESKE WILLERSLEV

## Ancient DNA's Intrepid Explorer

After fending off bears, surviving frostbite, and trapping furs in Siberia, Eske Willerslev turned to genetics and is now pushing the boundaries of ancient DNA research



Polar pause. Armed against polar bears, Eske Willerslev takes a break during an expedition last year in Greenland.

COPENHAGEN, DENMARK—In the basement of the Niels Bohr Institute in Copenhagen, Jørgen Peder Steffensen pulls a puffy pale blue parka over his t-shirt and shorts and steps inside a storage locker cooled to a constant  $-26^{\circ}\text{C}$ . After digging through one of the hundreds of cardboard boxes stacked inside, the bearded climatologist lifts out a dirty, plastic-wrapped cylinder of ice about 55 cm long.

The frozen chunk was cut from the bottom of an ice core drilled through Greenland's ice cap in 1981 as part of a project to look at past climate. But this core bottom was considered too disturbed by the glacier above and too contaminated with silt and dirt from below to yield much information, says Steffensen. "I've taken care of this dirty, insignificant piece of ice for 26 years," he yells as refriger-

ation units thunder overhead. "It was only during discussions with Eske that we homed in on a use for it."

Eske Willerslev, the director of the Centre for Ancient Genetics at the University of Copenhagen, has spent the past 8 years teasing information about the distant past from discarded ice and even less likely places. Since first extracting DNA from glacial ice in 1999, the 36-year-old biologist has pioneered what he calls "dirt DNA"—the extraction and cloning of plant and animal DNA from just a few grams of soil and ice. In 2003, he redefined ancient DNA research when he extracted the 300,000- to 400,000-year-old DNA of mammoths, bison, mosses, and much more from small samples of soil he collected from the Siberian permafrost (*Science*,

18 April 2003, p. 407). It was the oldest DNA ever discovered by more than 200,000 years.

Not long after that, Willerslev began to wonder about the ignored ice core bottoms in the building his lab shared with Steffensen's climate research group. "I did the permafrost stuff, and then suddenly it hit me: Silty ice is icy permafrost, right?" Judiciously cutting and melting the core bottoms, Willerslev and his colleagues analyzed the resulting water for signs of DNA. What Willerslev found, and reports on page 111, broke his own record for the oldest DNA ever recovered, and promises to rewrite the history of Greenland's climate. His team identified and dated genetic sequences from coniferous trees, butterflies, beetles, and a variety of other boreal forest plants—traces of ancient forests that Willerslev says covered southern Greenland perhaps as far back as 800,000 years ago.

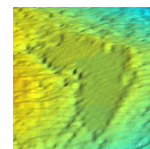
The results have impressed his colleagues in the close-knit, highly competitive ancient DNA research community. "To go from dirty water to a forest full of insects is pretty amazing," says Matthew Collins of the University of York in the U.K. "It's spectacular how far he appears to have gone back this time."

### From fur-trapping to genetics

Willerslev and his identical twin Rane grew up reading about Danish legends such as Arctic explorer Knud Rasmussen and devouring *Buddy Longway*, a popular Belgian comic book that chronicled the adventures of a fur-clad American mountain man. "I always thought I was born 200 years too late," Eske says. "Exploring America in the beginning would have fit me perfectly."

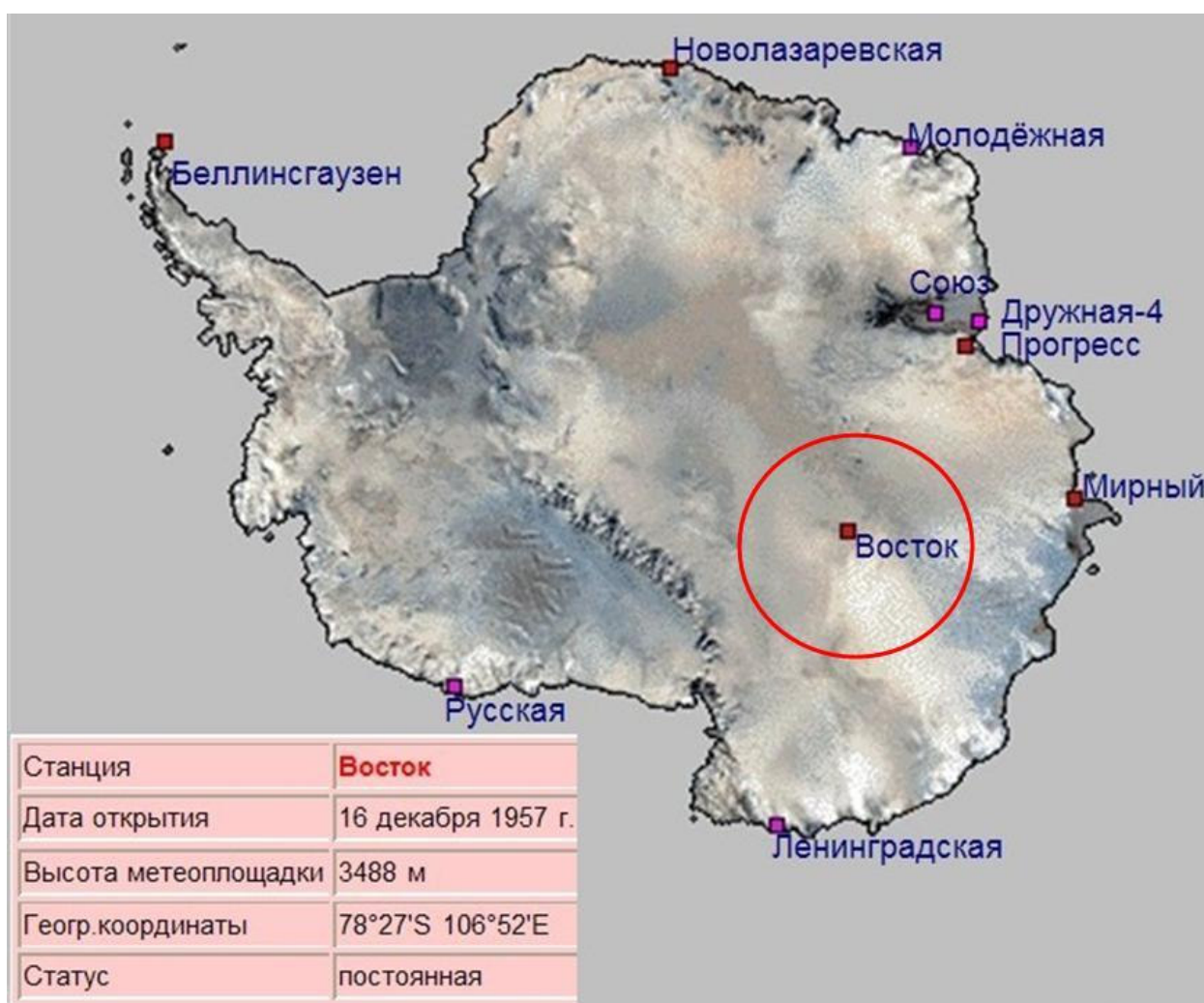
CREDIT: SVEND FULLER

Downloaded from www.sciencemag.org on July 7, 2007



## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

**Демонстрационный материал** к положению дел в области комплексного биогеохимического исследования подледникового озера Восток (Антарктида) в ПИЯФ РАН (материалы С.А. Булата)



Российские станции в Антарктиде – станция ВОСТОК



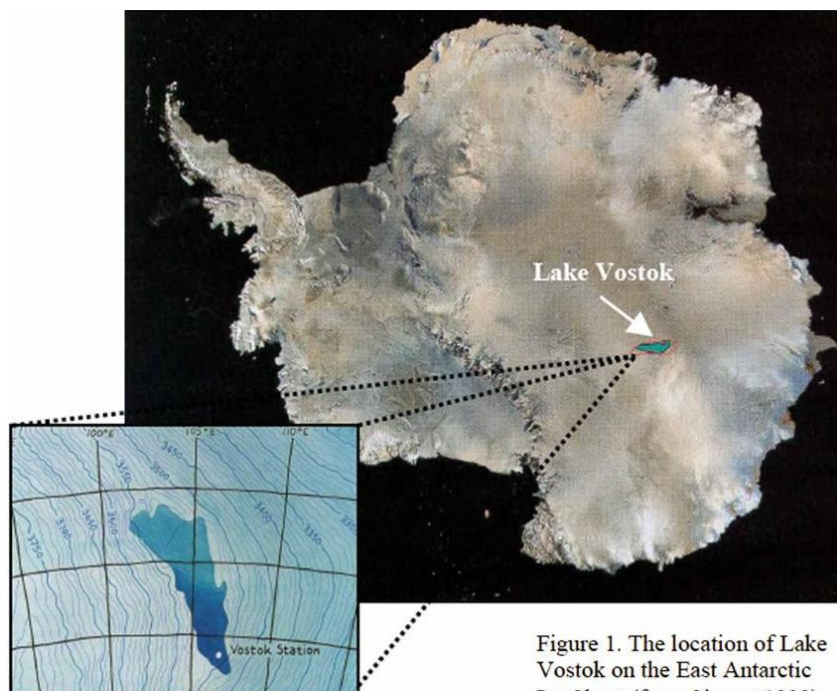
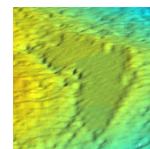
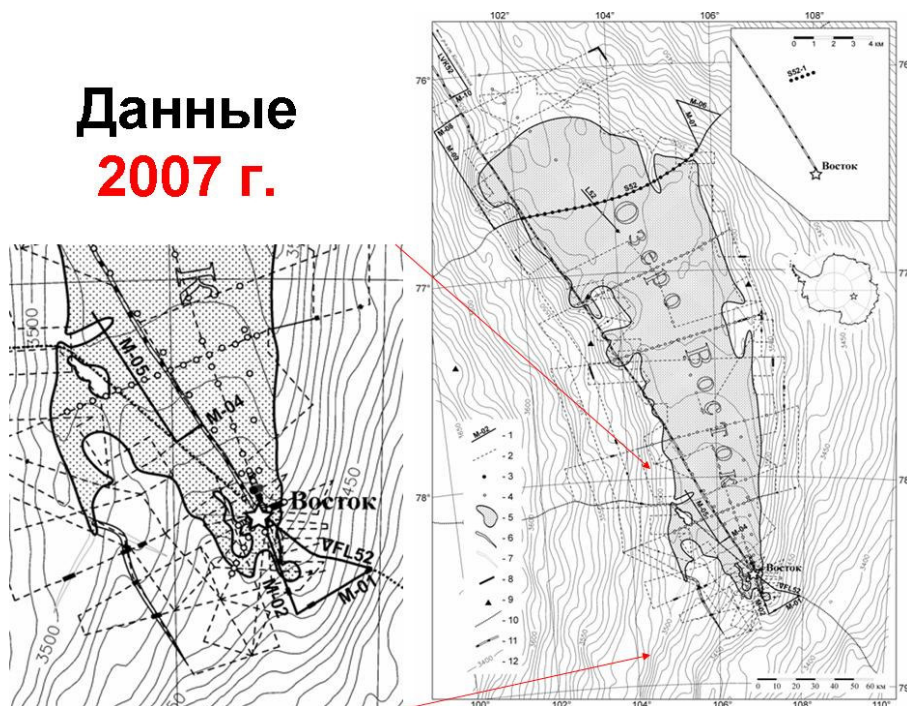


Figure 1. The location of Lake Vostok on the East Antarctic Ice Sheet (from Siegert 1999).

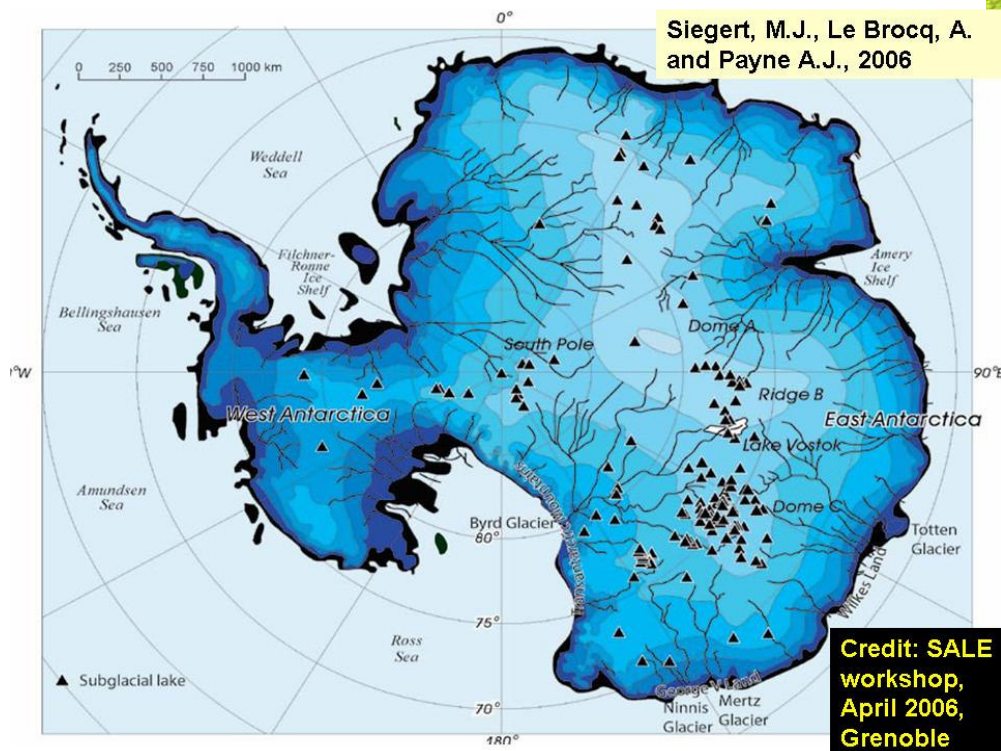
### Открытие озера Восток.

Об открытии озера впервые было сообщено на 23-й сессии СКАР в Риме в 1994 г. Геофизические данные были опубликованы только в 1996 г. в журнале *Nature* (Kapitsa et al., 1996)

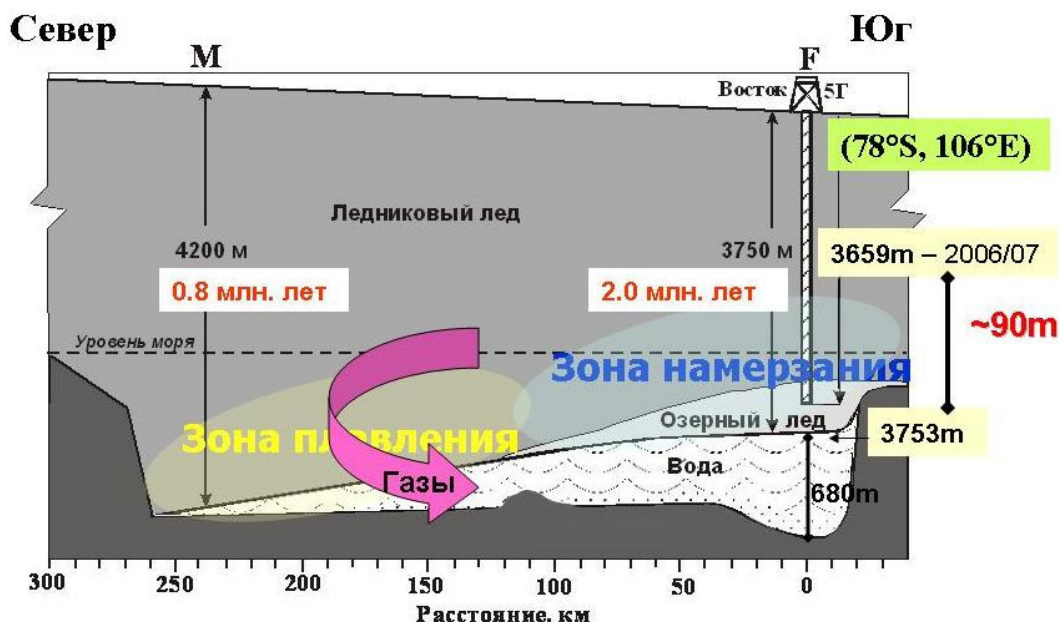
### Данные 2007 г.



Подледниковый рельеф (береговая черта) озера Восток по данным Полярной морской геологоразведочной экспедиции 2007 г.

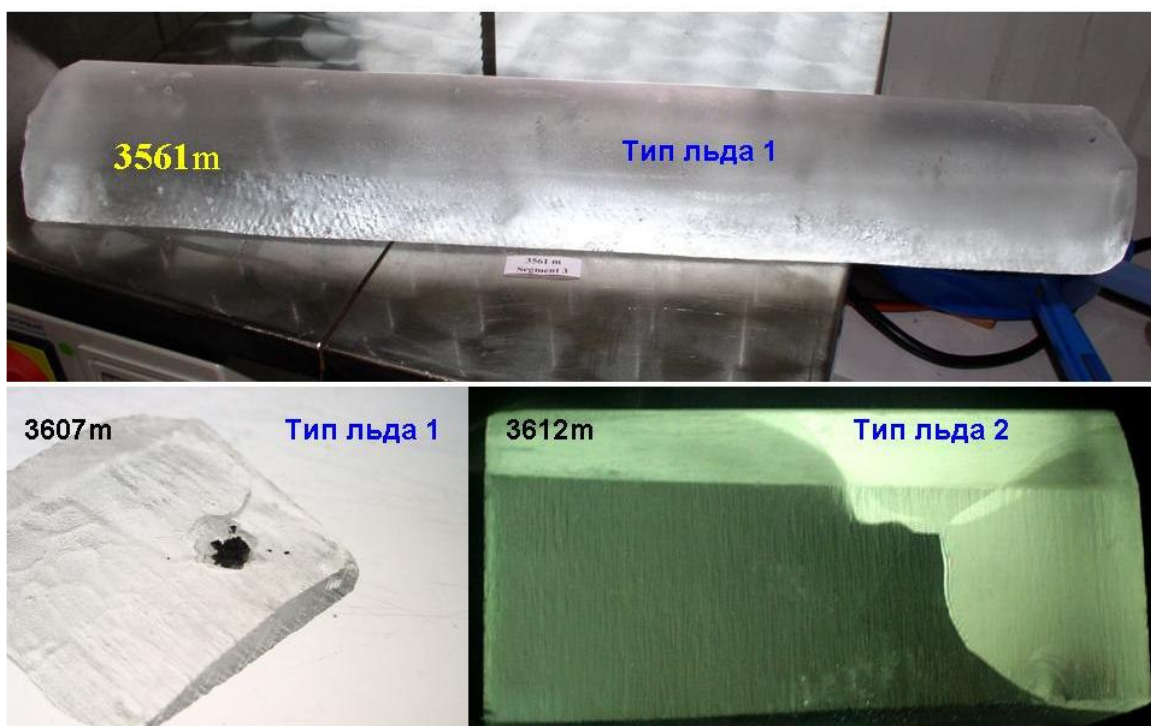
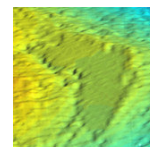


Подледниковые озера в Антарктиде (более 145 озер и водных резервуаров) и предполагаемые подледниковые реки (водные пути), которые объединяют их в единую сеть. Озеро Восток пока единственное наиболее крупное.



Продольный разрез озера Восток и схема глубокого бурения во льду. В настоящее время скважина находится в озерном льду (замерзшей воды озера) на глубине 3663.41 м (2 июля 2007 г.). До границы лед-вода озера осталось не более 85 м.



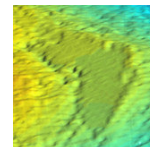


Образцы озерного льда двух типов

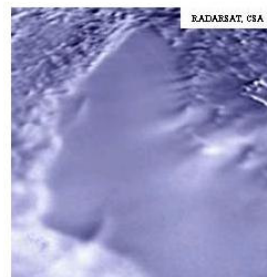


**Ламинары класса 100 в чистой комнате класса 10,000**  
Лабораторные условия, необходимые для проведения надежного  
молекулярно-биологического анализа льда на биологическое  
содержание

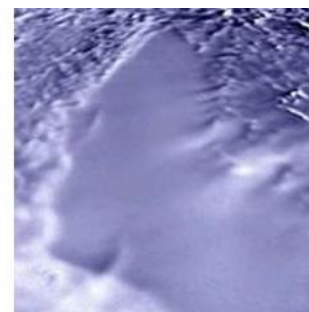
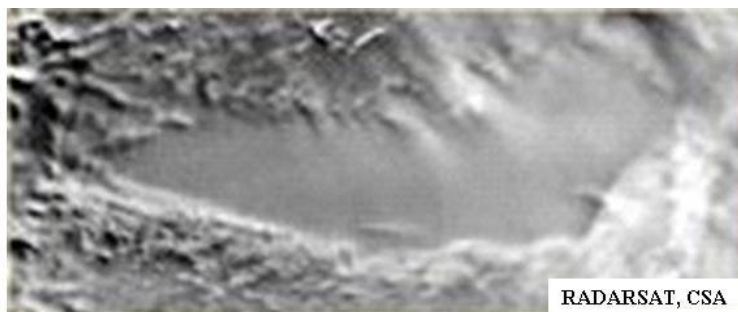




- **Гигантское озеро**
  - 275 x 65 km - размер; 15900 km<sup>2</sup> - площадь; 4600 km<sup>3</sup> воды
  - Два котлована (южный глубокий, северный мелководный)
  - Средняя глубина - 300 m; максимальная глубина – ~1650 m (южный котлован – в районе станции Восток)
  - Обновление воды – каждые 80-100 тыс. лет
- **Погребено** под 4200-3750 m ледовым щитом (3.5 km над уровнем моря)
  - Возраст ледника на подошве от 0.8 до 2.0 млн. лет
- **Изолировано** от поверхностной биоты на протяжении как минимум 15 млн. лет
  - Существовало до оледенения Антарктиды
- **Высокое давление**
  - 337-377 атм.
- **Средняя температура воды**
  - -2.65°C
- **Растворенный органический углерод**
  - (<10 ppbC)
- **Нет света**
- **Перенасыщено кислородом**
  - 700-1200 мг/л
  - Сильно окисленная среда (нет возможности для редокс реакций?)
- **Пресноводное**
  - Соли менее 0.10 ‰



Свойства воды или самого озера, имеющие отношение к его биологическому потенциалу



**«Любящие кислород»**  
**[аэробные]**  
**хемоавтотрофные**  
**пьезофильные**  
**психрофилы**

Ожидаемые формы микробной жизни в воде озера. «Любящие кислород» прокариоты науке не известны.

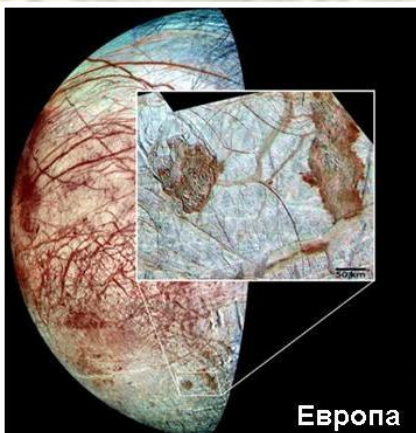
Озерный лед Образцы (м)	Надежные + ненадежные <sup>#</sup> виды	Ближайший родственник
<b>Тип 1</b>		<b>Аэробный</b> <b>Гетеротрофный</b> <b>Психрофил</b>
3551	0	
3561 (2 x)	1 <sup>#</sup>	<i>Carnobacterium sp<sup>#</sup></i>
3593	0	
<b>3607 (3 x)</b>	<b>1 + 1<sup>#</sup> + 1<sup>#</sup></b>	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> <i>OP11 Candidate division<sup>#</sup></i> <i>Rhodocyclus spp. group<sup>#</sup></i>
<b>Тип 2</b>		<b>Анаэробный</b> <b>Автотрофный</b> <b>Термофил</b> 50 - 52°C
3612	0	
3619 (3 x)	0	
3623	0	<b>Аэробные</b> <b>Гетеротрофный (?)</b> <b>Мезофил (?)</b>

Виды бактерий, обнаруженные в озерном льду озера Восток. Ни один из видов по своим свойствам полностью не удовлетворяет ожиданиям (см. предыдущий рисунок).

- Глубоко подо льдом
- Высокое давление
- Постоянный холод
- Перенасыщено кислородом
- Сильно окисленная среда
- Ультра-олиготрофное
- Длительно изолировано
- **Ультра-низкая биомасса**

Озеро Восток

RADARSAT, CSA



Европа



Марс

Подледниковое озеро Восток как уникальный Земной аналог ледяных планет и лун