МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕОМИКРОБИОЛОГИЯ ЭКОСИСТЕМЫ ПОДЛЕДНИКОВОГО ОЗЕРА ВОСТОК В АНТАРКТИДЕ

С.А. Булат[1], И.А. Алехина[1], Ж.Р. Пети[2], В.Я. Липенков[3], В.В. Лукин[3]
[1] Петербургский Институт Ядерной Физики РАН, Санкт Петербург-Гатчина, Россия.
[2] Лаборатория Гляциологии и Геофизики Окружающей Среды НЦНИ, Гренобль, Франция.
[3] Институт Арктики и Антарктики, Санкт Петербург, Россия.

Контакты: С.А. Булат
Tel.: +7-813 71-46625
Fax: +7-813 71-32303
E-mail: bulat@omrb.pnpi.spb.ru

Подледниковые антарктические озера (Рис. 1) в настоящее время рассматриваются в качестве уникальных Земных аналогов ледовых условий, вероятно существующих на полюсах Марса или спутниках Юпитера (Европа) или Сатурна (Энцеладус) (Рис. 2), и поэтому возможность таких сред содержать микробную жизнь привлекает особое внимание. Из таких озер наиболее известным и изученным является крупнейшее подледниковое озеро Восток (Рис. 3).

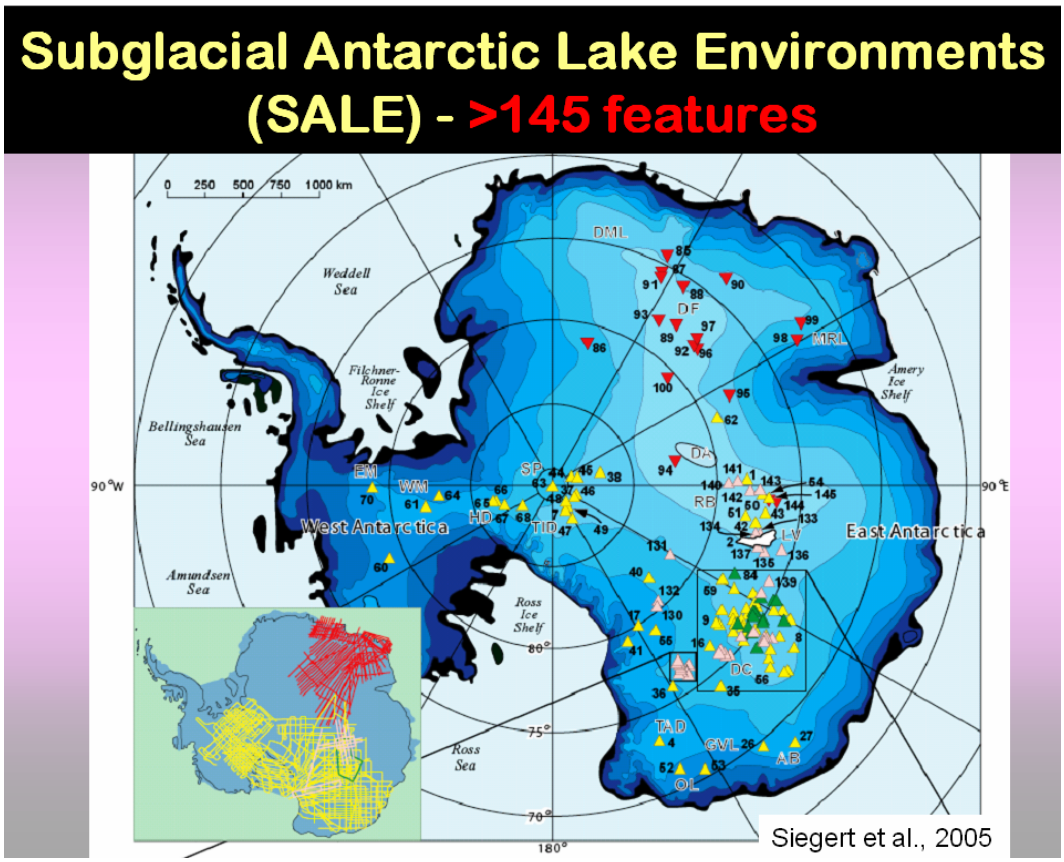


Рис.1. Подледниковые озера и другие водоемы, обнаруженные в Антарктиде по настоящее время методами дистанционного зондирования [10].

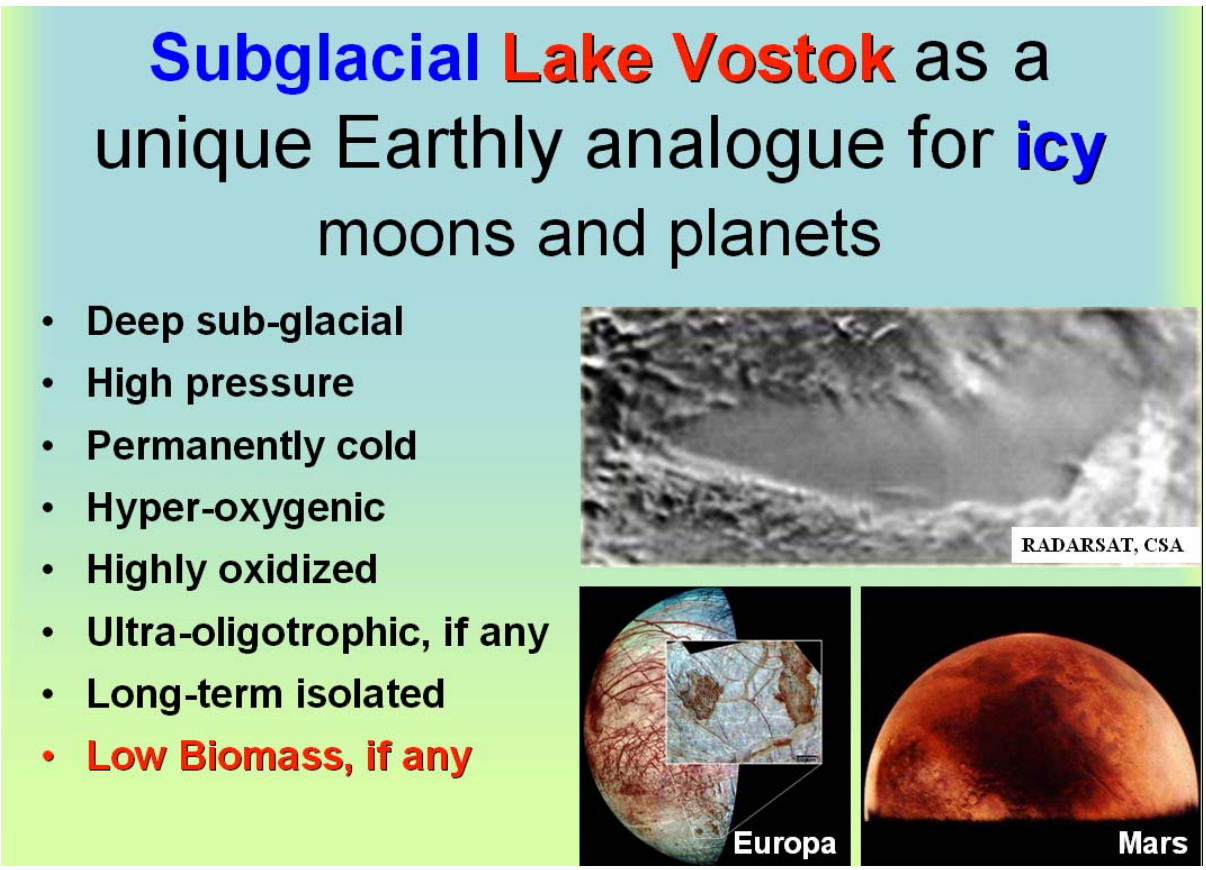


Рис. 2. Подледниковое озеро Восток как аналог ледниковых планет и лун

Рис. 3. Открытие озера Восток в Антарктиде и его вид из космоса

Именно изучение Антарктичеких 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 [5, 8], большая вероятность «прямого» загрязнения образцов чужеродной микрофлорой требует особых предосторожностей при интерпретации полученных результатов [2, 9] (Рис. 4).

Рис. 4. Образцы озерного льда двух типов и содержание микробных клеток по данным проточной цитофлюорометрии

Задачей нашего исследования было оценить микробное содержание в озерном льду озера Восток, погребенном под 4-километровым Восточно-антарктическом ледовым панцирем [4] (Рис. 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 (Рис. 6).

Основным методами исследования были методы молекулярной филогенетики, в частности секвенирование (ДНК-анализ) генов малой субъединицы рибосомной РНК бактерий и архебактерий с соблюдением критериев изучения и установления подлинности «древней» ДНК [12] (Рис. 7, 8). Оценку количества клеток осуществляли проточной цитофлуорометрией.

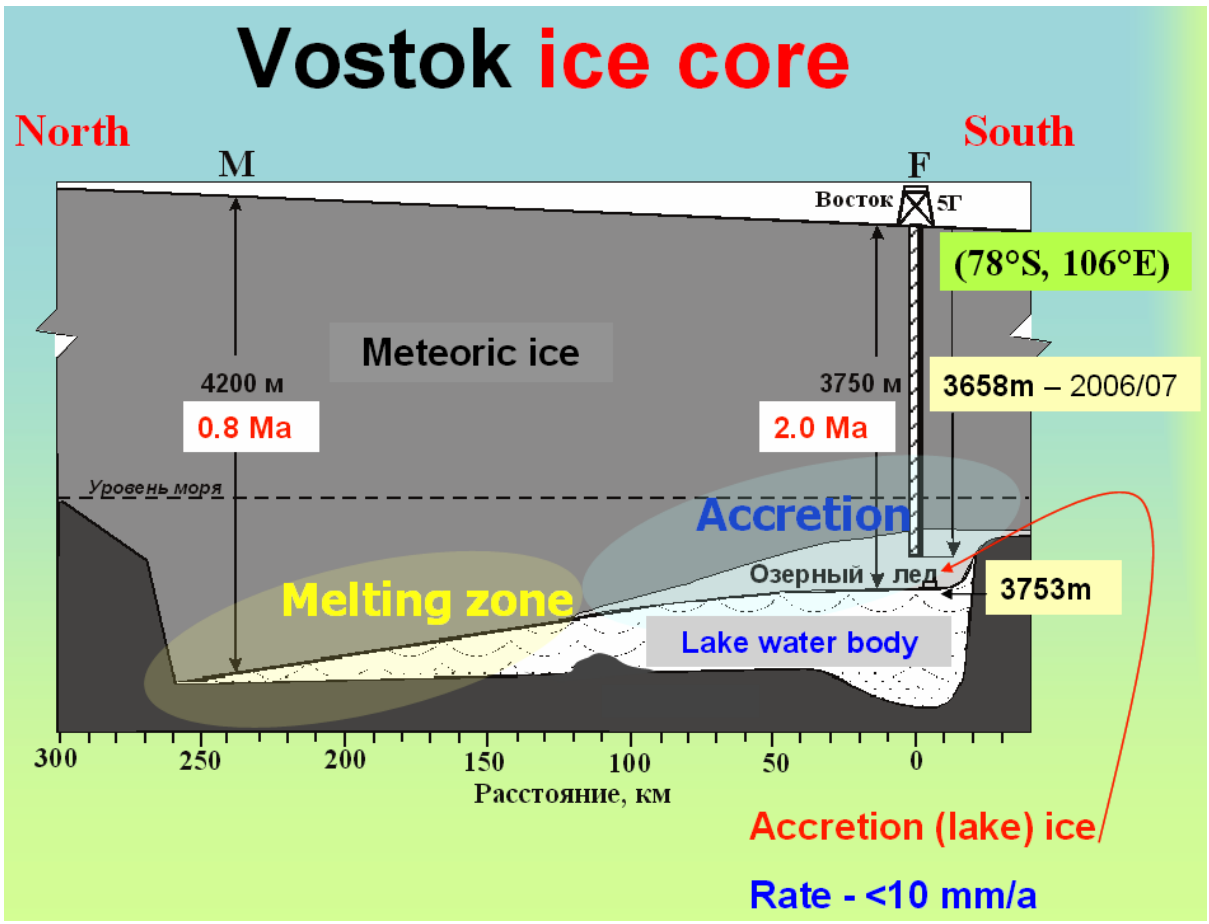


Рис. 5. Схема керна льда Восток в продольном разрезе озера Восток

Озерный лед, полученный при глубоком бурении во льду на станции Восток [3] (Рис. 5), 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 полная биодеконтаминация [9], включая полное удаление следов жидкости для бурения, которая сама по себе представляет среду, пригодную для существования микроорганизмов [1].

Возраст озерного льда оценивается максимум в 20 тыс. лет [7] (Рис. 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 ультра-олиготрофных 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

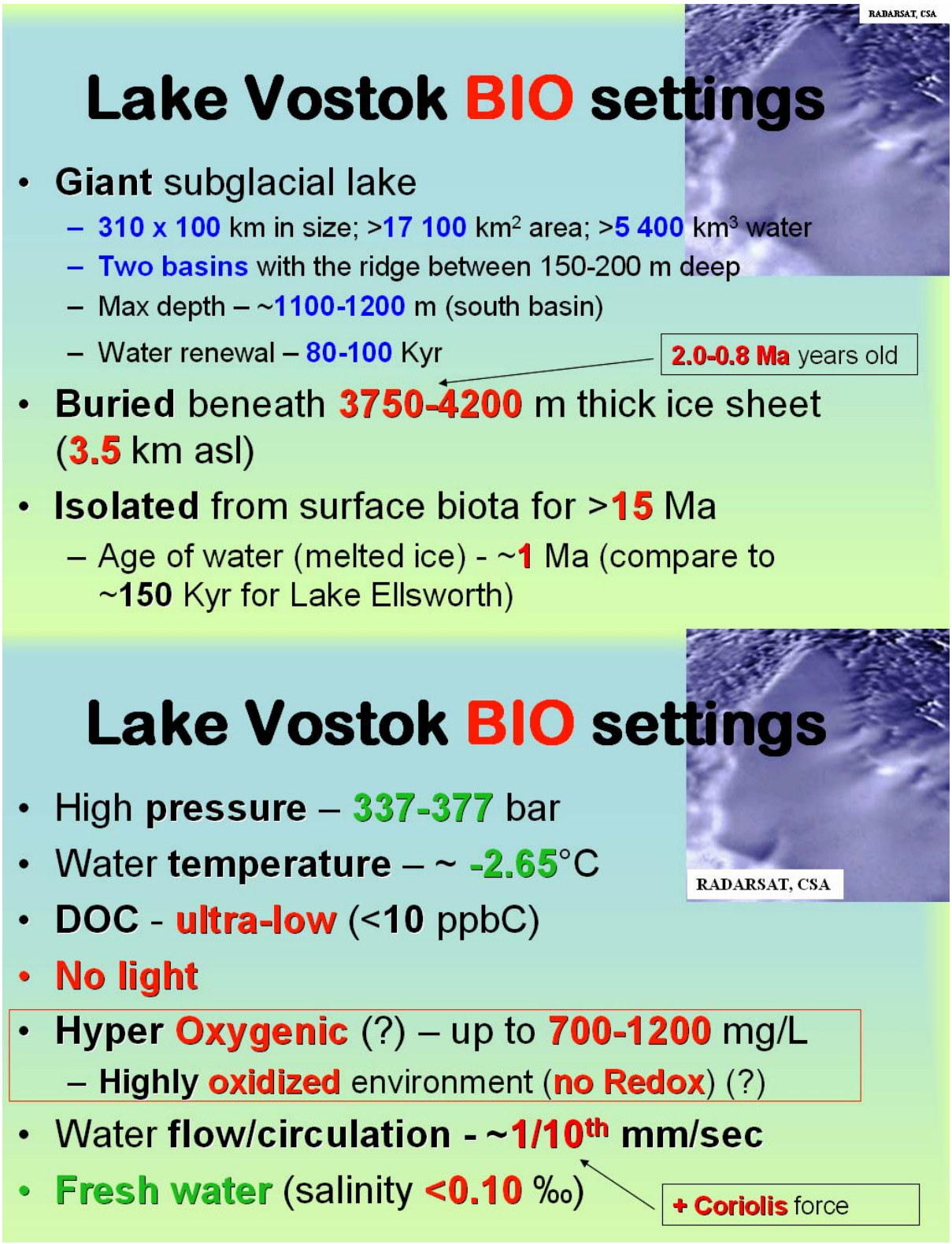


Рис. 6. Биологические характеристики водной колонки озера Восток (Coriolis force – отклонение в движении объекта вследствие вращения Земли)

Рис. 7. Условия и биологические контроли, необходимые для проведения надежного молекулярного биологического анализа льда на биологическое содержание

только предсказано и будет количественно измерено в ближайшее время. Температура всего слоя озерного льда не превышает -7°C, что находится в пределах так называемой физиологической температуры, при которой экспериментально показан факт метаболической активности бактерий [1]. 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 (Рис. 10).

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 (Рис. 6, 11). 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 [13]). Однако в обоих случаях микроорганизмы должны быть хемоавтотрофами по способу получения энергии и психрофильными и пьезофильными по физиологии (Рис. 12, 13).

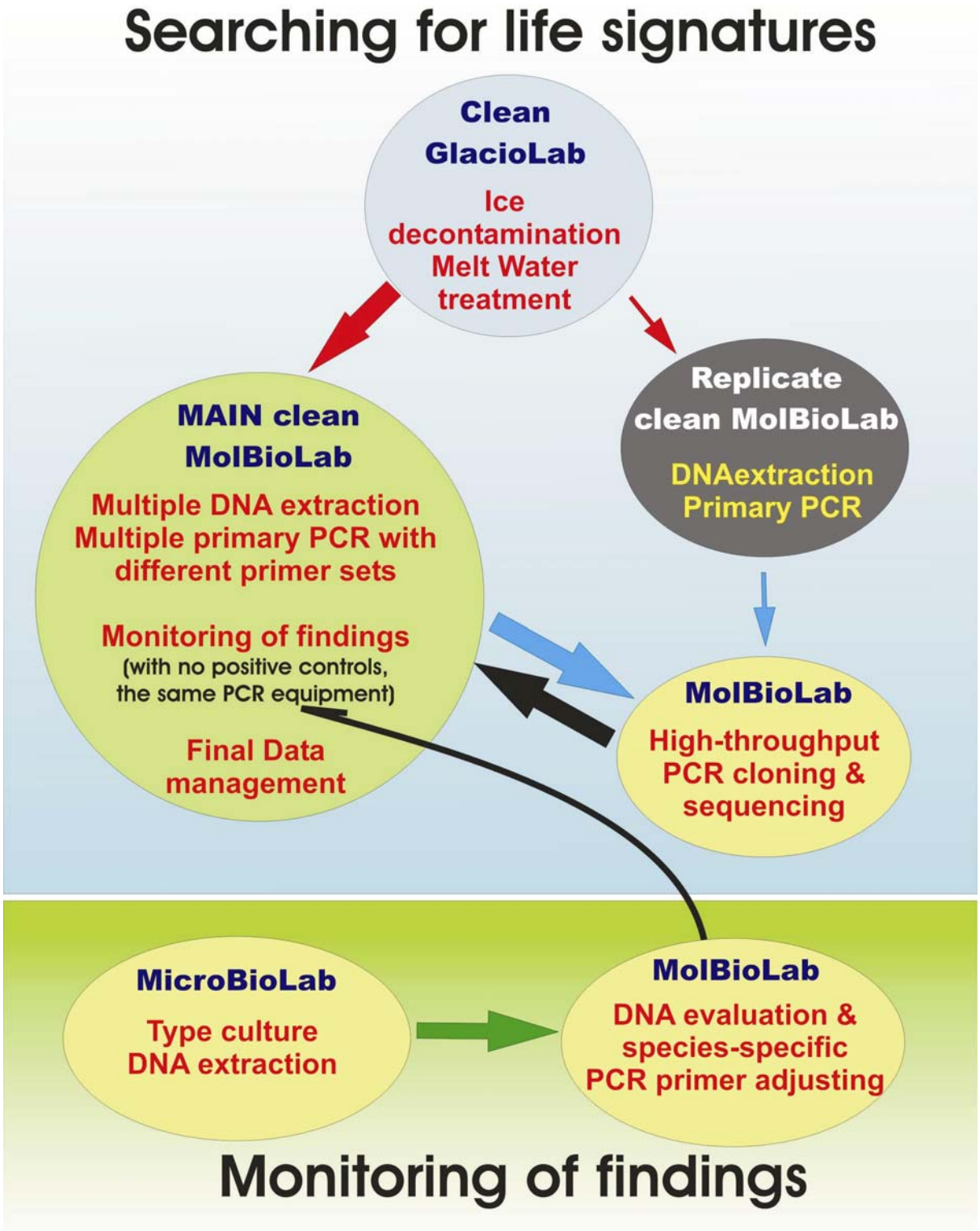


Рис. 8. Схема лабораторной сети для проведения надежного молекулярного биологического анализа льда на биологическое содержание

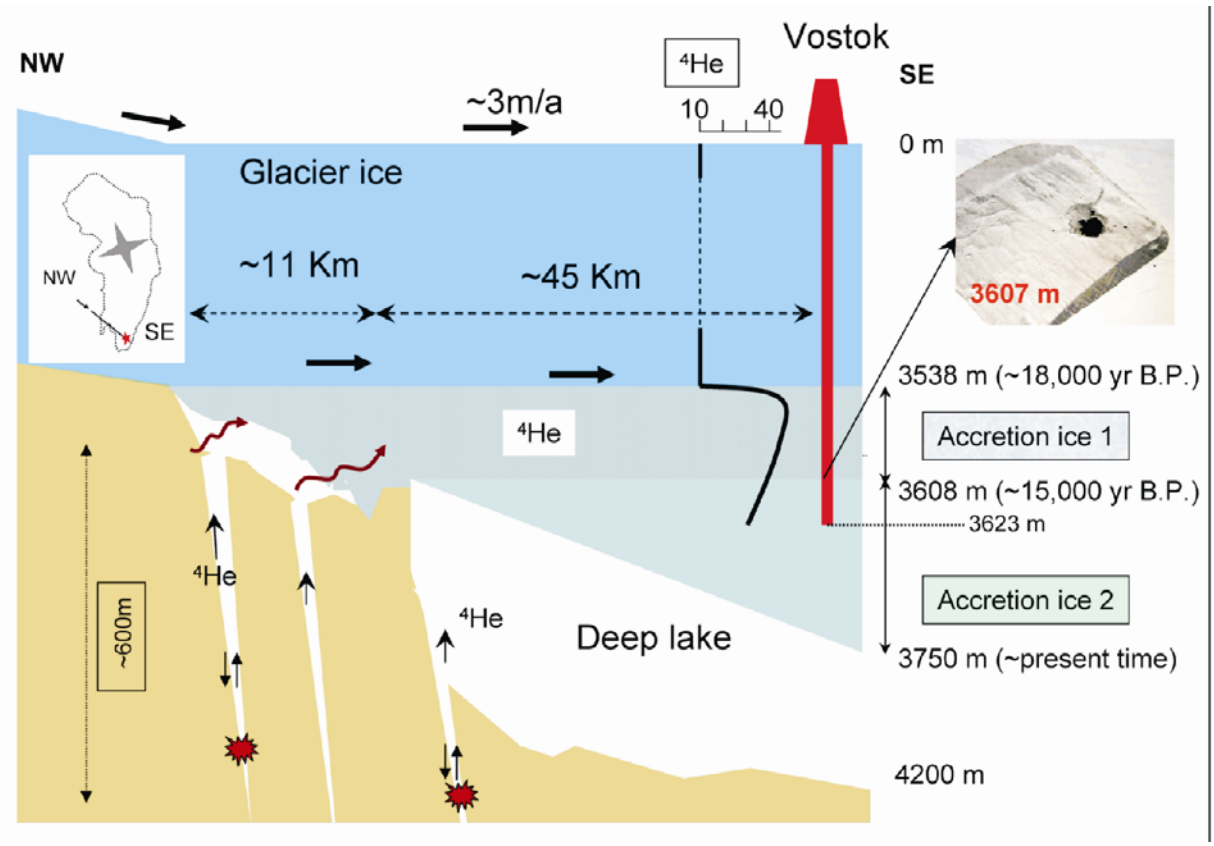
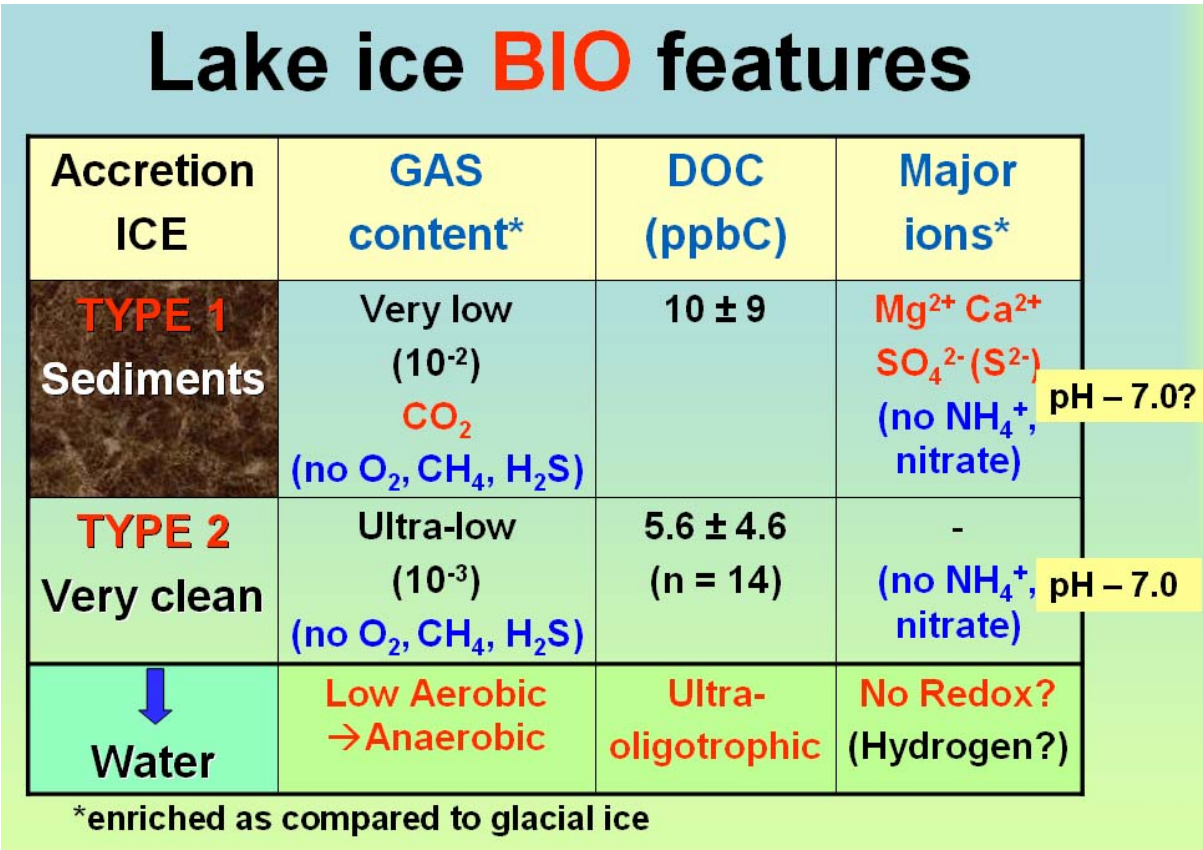


Рис. 9. Схема керна льда Восток в поперечном разрезе озера Восток (ток льда слева направо)



Lake ice BIO features

Accretion ICE	GAS content*	DOC (ppbC)	Major ions*
TYPE 1 Sediments	Very low (10^{-2}) CO_2 (no O_2, CH_4, H_2S)	10 ± 9	Mg^{2+} Ca^{2+} SO_4^{2-} (S^{2-}) (no NH_4^+, nitrate) pH – 7.0?
TYPE 2 Very clean	Ultra-low (10^{-3}) (no O_2, CH_4, H_2S)	5.6 ± 4.6 (n = 14)	- (no NH_4^+, nitrate) pH – 7.0
↓ Water	Low Aerobic → Anaerobic	Ultra-oligotrophic	No Redox? (Hydrogen?)

*enriched as compared to glacial ice

Рис. 10. Биологические характеристики озерного льда

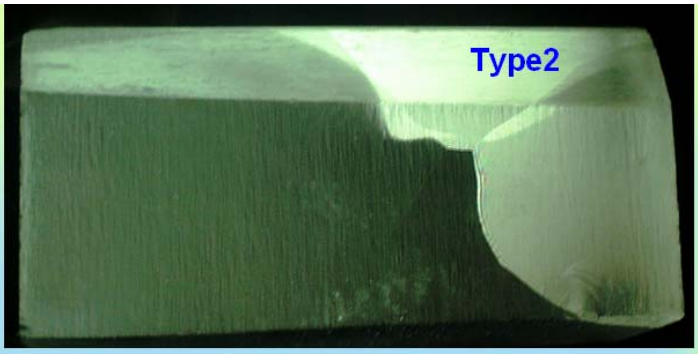
OXYGEN in Vostok ice core

Dissolved in crystal lattice

V. Lipenkov, pers. comm.

Ice	Depth (m)	Oxygen (mkM)	Bio features
Glacier ice	100 – 3538	15.0 (dissolved + air bubbles + hydrates)	Aerobic
Lake ice	TYPE 1 3539 - 3608	0.4	Low
	TYPE 2 3609 - 3623	0.0	Anaerobic
Water			

Рис. 11. Содержание кислорода в озерном льду



Life potential in lake ice 1

Anaerobic chemoautotrophic piezophilic psychrophiles?

?

Low Aerobic

Hydrogen?

Limiting life temperature threshold -20°C

(Astrobiology, 2006, 6, 677-732)

Рис. 12. Ожидаемые микробные формы (по типу метаболизма) в озерном льду типа 1

Рис. 13. Ожидаемые микробные формы (по типу метаболизма) в водной колонке озера

Проведенные исследования образцов озерного льда методами ДНК анализа показали, что этот лед в целом является исключительно чистым, не содержащим ни бактериальную, ни архебактеральную ДНК. До настоящего времени лишь несколько бактериальных филотипов были вскрыты в образцах озерного льда 1-го типа, содержащего глинисто-слюдяные включения (Рис. 14). 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 [2]. 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 истинным термофилом и хемоавтотрофом бактерией *Hydrogenophilus thermoluteolus* [2] (Рис. 14, 15). Впервые эта бактерия была обнаружена в образце льда с глубины 3607 м [2], но в последующем была подтверждена в другом горизонте льда 1-го типа (3561 м) [6]. Интересно, что данные горизонты разделены между собой слоем льда толщиной 47 м и возрастом около 5 тыс. лет.

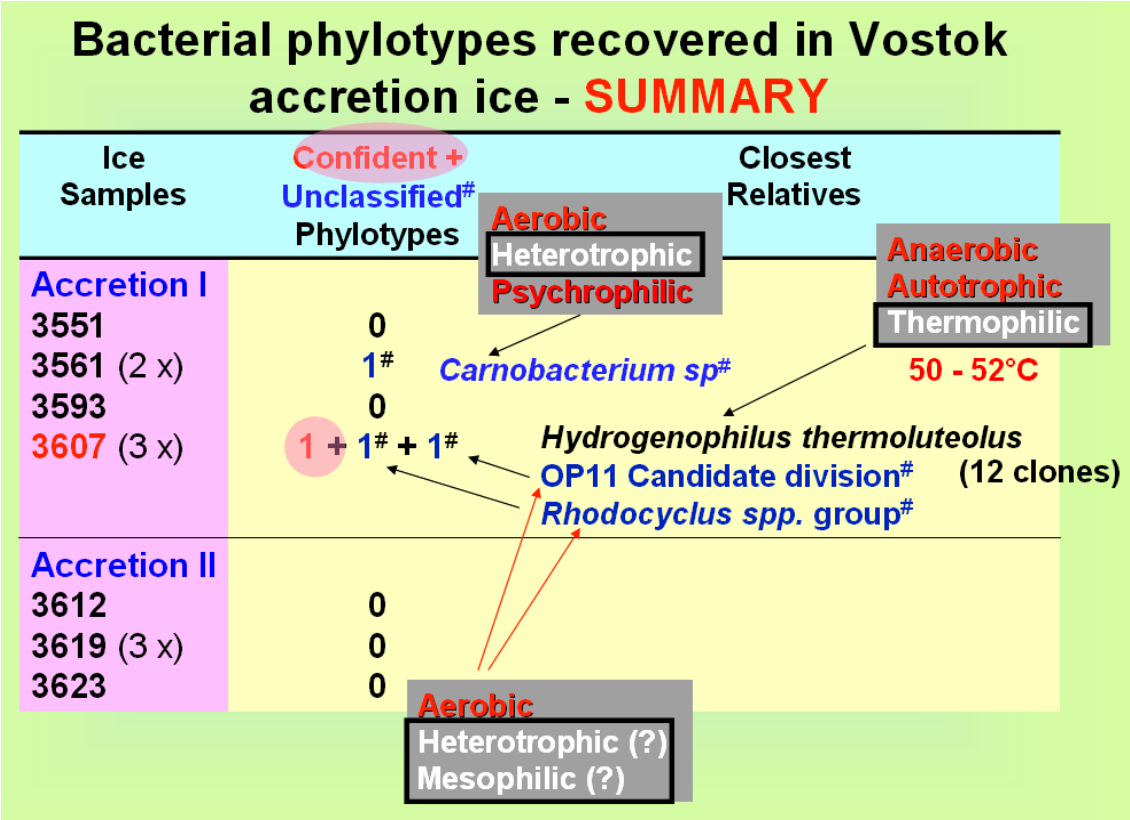


Рис. 14. Находки в озерном льду типа 1 [2]. Красным шрифтом выделены свойства, удовлетворяющие предсказаниям (Рис. 12, 13), тогда как белым шрифтом – противоречащие предсказаниям.

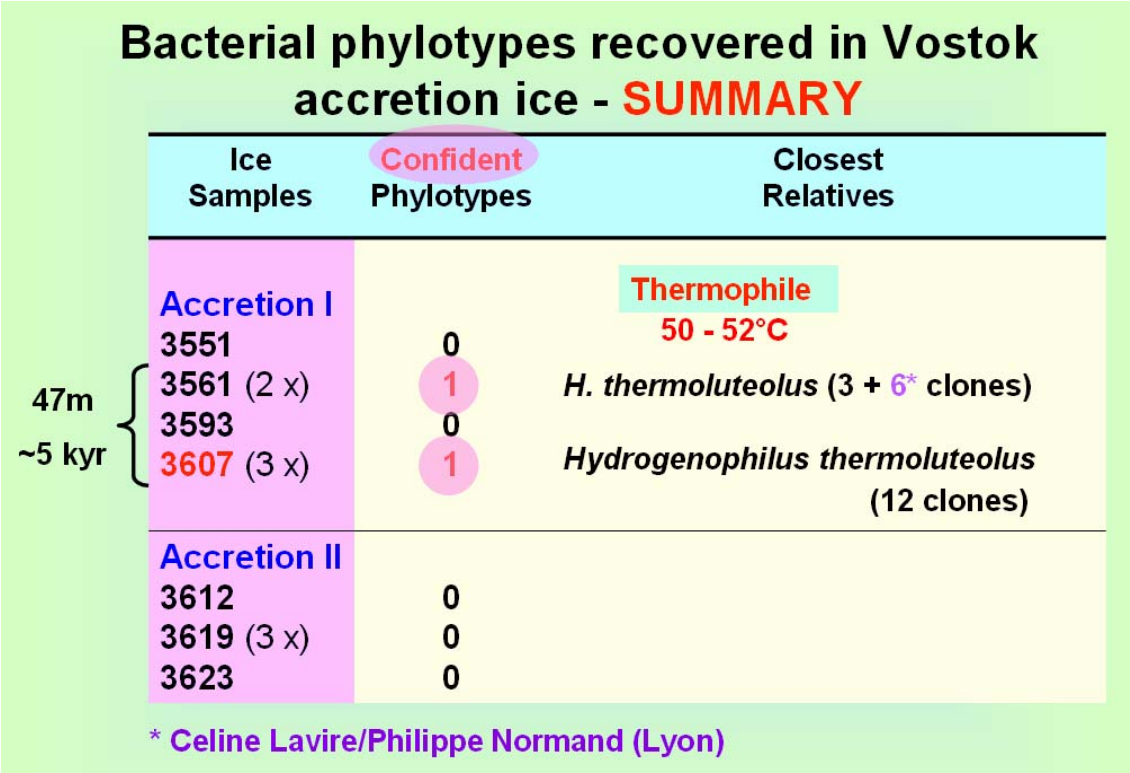


Рис. 15. Термофильные бактерии, обнаруженные в озерном льду типа 1 (Bulat et al., 2004; Lavire et al., 2006)

Термофильные бактерии, обнаруженные по ДНК-отпечаткам в озерном льду 1-го типа, по всей видимости, обитают не в самой воде озера (температура -2°C - -3°C), а в его основании [2]. Было предположено, что они могут жить в относительно теплых (40°C - 60°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 [11] (Рис. 16, 17). Существует несколько геологических и геофизических подтверждений такого сценария [2, 7]. 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.

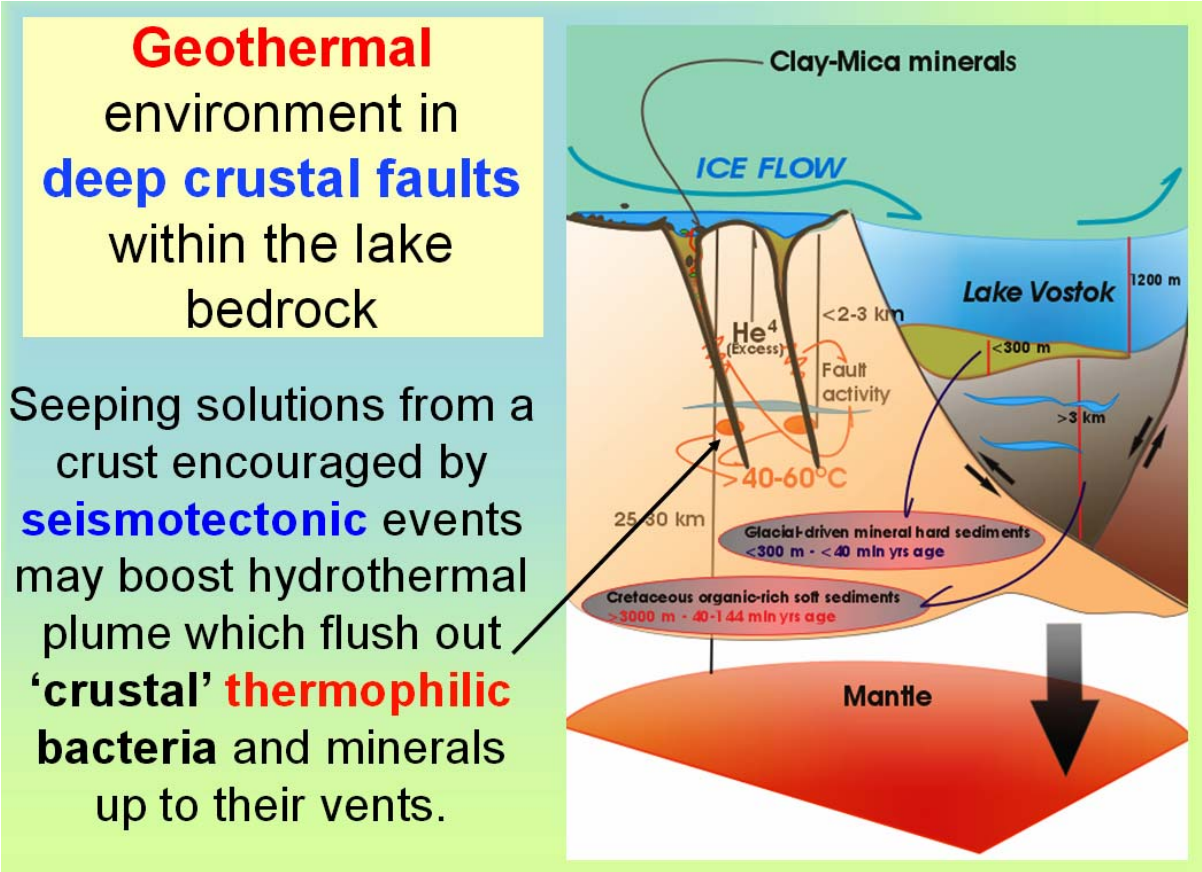


Рис. 16. Геотермальное окружение (среда) озера Восток (в его основании) и термофильные бактерии в озерном льду типа 1

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 (Рис. 17, 18).

Результаты ДНК анализа озерного льда были подтверждены прямыми методами флуоресцентной и лазерной конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии и проточной флуорометрии. Все методы микроскопии не позволили обнаружить микробные клетки в тщательно деконтаминированном озерном льду. Лишь метод проточной цитофлуорометрии 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 [5, 8], 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.

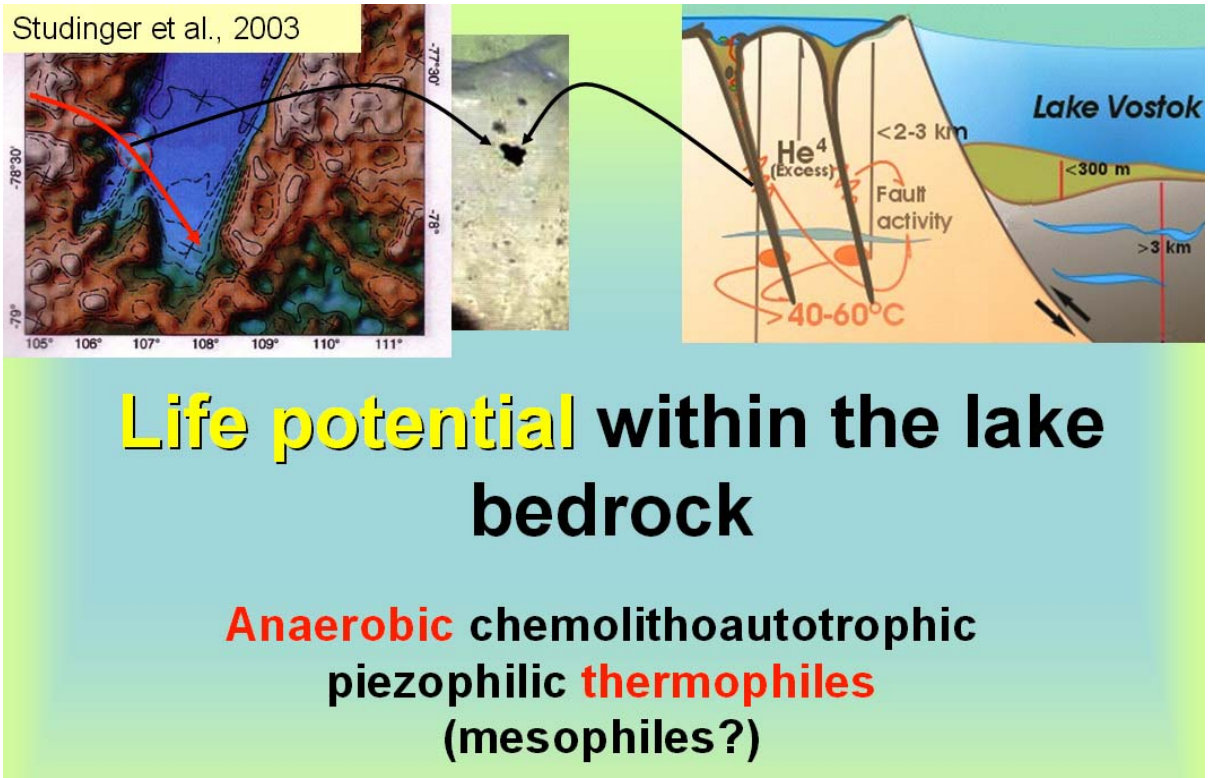


Рис. 17. Ожидаемые микробные формы (по типу метаболизма) в основании (осадочных породах) озера Восток

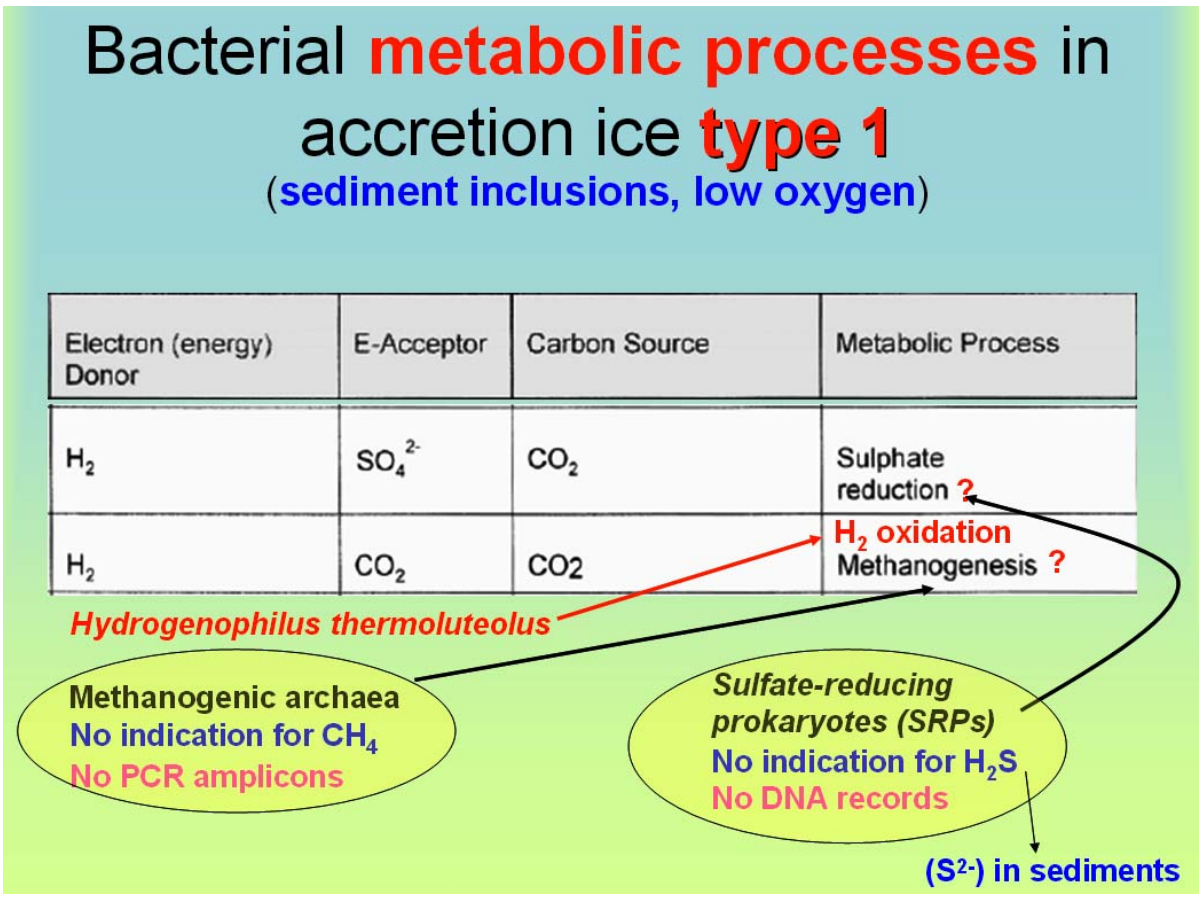


Рис. 18. Ожидаемые (и происходящие) бактериальные метаболические процессы в озерном льду типа 1

Таким образом, вопрос о существовании жизни в озере Восток остается пока открытым. 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. *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. –2007. –Vol.59. –P. 289–299.
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. –2004. –Vol.3. –P. 1–7.

3. *Jouzel J., Petit J.R., Souchez R. et al.* More than 200 meters of lake ice above subglacial Lake Vostok, Antarctica // Science. –1999. –Vol.286. –P. 2138–2141.
4. *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. –1996. –Vol.381. –P. 684–686.
5. *Karl D.M., Bird D.F., Bjorkman K. et al.* Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica // Science. –1999. –Vol.286. –P. 2144–2147.
6. *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. –2006. –Vol.8. –P. 2106–2114.
7. *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. –2005. –Vol.I. –P. 227–288.
8. *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.
9. *Priscu J.C., Kennicutt II M.C., Bell R.E. et al.* Exploring subglacial antarctic lake environments // EOS. –2005. –Vol.86. –P. 193, 197.
10. *Siegert M.J., Carter S., Tabacco I., Popov S., Blankenship D.D.* A revised inventory of Antarctic subglacial lakes // Antarctic Science. –2005. –Vol.17. –P.453–460.
11. *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. –2003. –Vol.205. P. 195–210.
12. *Willerslev E., Cooper A.* Ancient DNA // Proc. R. Soc. B. –2005. –Vol.272. –P. 3–16.
13. *Wingham D.J., Siegert M.J., Shepherd A. et al.* Rapid discharge connects Antarctic subglacial lakes // Nature. –2006. –Vol.440. –P. 1033–1036.