

На правах рукописи

ПЕРВУШИНА Ксения Александровна

**МИКРООРГАНИЗМЫ ЦИКЛА УГЛЕРОДА В ОСАДОЧНЫХ
ПОРОДАХ ВЕНДА МОСКОВСКОЙ СИНЕКЛИЗЫ**

Специальность 03.00.16 – экология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Ярославль – 2007

Работа выполнена на кафедре ботаники и микробиологии в Ярославском государственном университете им. П.Г. Демидова.

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Шеховцова Нина Валентиновна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Ананьева Надежда Дмитриевна
доктор биологических наук, профессор
Ястребов Михаил Васильевич

Ведущая организация: Самарский государственный университет

Защита диссертации состоится _____ 2007 г. в _____ на заседании диссертационного совета **К 212.002.01** при Ярославском государственном университете им. П.Г. Демидова по адресу:
150057, г. Ярославль, проезд Матросова, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова по адресу:
150000, г. Ярославль, ул. Полушкина роща, д. 1.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2007 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Швыркова Н.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время установлено (Оборин и др., 2004), что микроорганизмы могут функционировать в литосфере на глубинах до 6820 м (Тюменская сверхглубокая скважина). Подземная биосфера участвует в регуляции потока вещества и энергии на нашей планете, поддерживая ее гомеостаз (Pedersen, 2000), при этом цикл углерода является ведущим в системе биогеохимических круговоротов и сопряжен с циклами других важнейших элементов – O, N, P и S (Заварзин, 2004). Максимальный возраст исследованных к настоящему времени осадочных отложений составил 400 млн лет и соответствовал девонским нефтеносным песчаникам, в которых обнаружили функционирующих анаэробных сульфатредукторов и метаногенов (Ivanov, Belyaev, 1983). Особенности микроорганизмов в докембрийских осадочных отложениях глубоких горизонтов земной коры и возможность их активности *in situ* в настоящее время, ранее не изучались. Имеющиеся сведения о распространении микроорганизмов и их активности, в подпочвенных горизонтах в целом фрагментарны, что послужило основой для концептуального подхода к изучению так называемой «подземной биосферы». В настоящее время известны: концепция гидробиохимической зональности подземных вод Крамаренко (1973); модель хемолитоавтотрофных экосистем – функционирующих в глубоких кристаллических породах за счет первичной продукции из CO₂ и H₂ – Стивенса (1995) и Педерсена (1997); концепция структурно-функциональных групп подземной биосферы Верховцевой и соавт. (1996), концепция трех «бактериальных фильтров» в литосфере Земли Оборина (2004). Тем не менее, прогностическое значение этих концепций остается дискуссионным, поскольку они основаны на изучении изолятов и не сопровождались применением методов молекулярной экологии. Оценить метаболические возможности подпочвенных микроорганизмов можно с помощью метода меченых атомов. Однако все вышеуказанные методы дороги, требуют специального оборудования и больших затрат времени. Нами выбран более дешевый и экспрессный метод анализа жирнокислотных биомаркеров в липидных профилях пород, который, благодаря при-

менению газовой хроматографии – масс-спектрометрии, позволяет определять количество микробных клеток и соотносить их с известными таксонами. Комплексный анализ биоценозов осадочных пород, залегающих на глубинах более 1000 м, основанный на сочетании методов, без выделения и с выделением культивируемых микроорганизмов, ранее не проводился.

Цель исследования: изучение биоразнообразия, численности и активности микроорганизмов основных эколого-трофических групп цикла углерода на примере осадочных пород венда Московской синеклизы с использованием маркерного анализа и микробиологических методов.

Задачи исследования:

1. Выделить доминантные эколого-трофические группы микроорганизмов цикла углерода в осадочных породах, вскрытых Высоковской поисковой скважиной №1, сочетая анализ биомаркеров в липидном профиле породы и выделение из нее микроорганизмов на лабораторных селективных средах.
2. Изучить качественные и количественные характеристики микроорганизмов каждой эколого-трофической группы.
3. Изучить адаптивные свойства микроорганизмов, выделенных из кернов осадочных пород, вскрытых Высоковской поисковой скважиной №1, к условиям подземной среды.
4. Оценить возможность биогеохимической активности микроорганизмов цикла углерода в осадочных породах, вскрытых Высоковской поисковой скважиной №1, в настоящее время.

Научная новизна работы. Впервые в осадочных породах венда Московской синеклизы с помощью анализа липидных биомаркеров определена общая численность микроорганизмов. Методами посева показано, что только часть пула микроорганизмов активна и высевается на питательные среды, ее массовая доля зависит от флюидопроницаемости пород. Результаты исследования свидетельствуют, что в осадочных породах подземной биосферы есть условия для сосуществования, как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов. Таким образом, впервые на основе комплексного анализа биоценозов осадочных пород, вскрытых в интервалах глубин 2350 – 2580 м,

сконструирована схема цикла углерода, протекание которого возможно в условиях изученных горизонтов.

Теоретическая и практическая значимость. Работа расширила существующие представления о подземной биосфере. Показана возможность функционирования цикла углерода в неисследованных ранее осадочных породах с различной флюидопроницаемостью – песчанике и аргиллите, вскрытых Высоковской скважиной.

В работе показана прогностическая значимость метода липидного анализа, который позволяет вести целенаправленный поиск микроорганизмов в породах еще до получения геологической информации. Подтверждением тому является идентификация изолированных из кернов бактерий pp. *Corynebacterium* и *Propionibacterium*, биомаркеры которых присутствовали в липидных профилях соответствующих пород. Выделенные микроорганизмы, могут быть потенциально перспективными объектами биотехнологии.

Экспериментально показано присутствие в породах пула микроорганизмов, который обнаруживает потенциальную активность при проникновении человека в недра Земли.

Результаты работы включены в содержание курсов «Экология организмов» (раздел «Экология микроорганизмов») и «Микробиология и вирусология» (раздел «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов») факультета биологии и экологии ЯрГУ им. П.Г. Демидова.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены, доложены и обсуждены:

- на региональных конференциях: 11-ой и 12-ой "Структура, вещество, история литосферы Тимано-Североуральского сегмента" (Сыктывкар, 2002, 2003); «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой" (Саратов, 2004); «Биоразнообразии Верхневолжья: состояние и проблемы сохранения» (Ярославль, 2004);

- на всероссийских конференциях: посвященной 200-летию ЯрГУ им. П.Г. Демидова (Ярославль, 2003); "Экологические механизмы динамики и

устойчивости биоты" (Екатеринбург, 2004); «Актуальные проблемы современной биологии» (Астрахань, 2005); «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005); аспирантов и студентов по приоритетному направлению «Рациональное природопользование» (Ярославль, 2005); «Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов» (Ярославль, 2006); «Наука. Образование. Молодежь» (Майкоп, 2007);

- на международных конференциях: «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биологический потенциал» (Пермь, 2005); «Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря» (Астрахань, 2005); интернет-конференции «Современные направления теоретических и прикладных исследований '2007» (Одесса, 2007); IV международном семинаре «Минералогия и жизнь» (Сыктывкар, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 1 статья в издании, рекомендованном ВАК.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Доминирующую эколого-трофическую группу осадочных пород венда Московской синеклизы составляют углеводородокисляющие микроорганизмы.

2. Обнаружившие активность микроорганизмы могут осуществлять в изученных горизонтах цикл углерода.

3. Основным фактором, определяющим интенсивность цикла углерода в исследуемых горизонтах, является флюидопроницаемость пород.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на страницах машинописного текста, иллюстрирована 48 таблицами и 17 рисунками. Список литературы включает 228 наименований работ.

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в работе и ценные рекомендации д.б.н. Г.А. Осипову (группа академика Ю.Ф. Исакова), д.б.н. А.Л. Степанову (МГУ) и геологу И.С. Грибовой (ФГУП НПЦ «Недра»).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили керны осадочных пород венда Московской синеклизы, вскрытых Высоковской поисковой скважиной №1 (ВПС-1) в интервале глубин 2358 – 2363 м (песчаник) и 2574 – 2580 м (аргиллит), а также изолированные из них культуры микроорганизмов. Значения параметров среды составили: температура – 37 и 39 °С; pH – 7,65 и 8,3; открытая пористость – 21,2 и 5,9%; газопроницаемость – 49,6 и 5,62 миллидарси (мД); содержание органического вещества ($C_{орг.}$) – 0,12 и 0,15% на породу, – в песчанике и аргиллите соответственно. Рассеянное органическое вещество (РОВ) обеих пород было представлено частицами сапропелевого и водорослевого детрита. В составе РОВ пород присутствовали битумоиды, содержавшие парафино-нафтеновые, ароматические углеводороды, легкие и тяжелые смолы, асфальтены; а также гуминовые кислоты и остаточное количество целлюлозы. В порах пород присутствовали N_2 , H_2 , CO_2 и углеводородные газы: метан, этан, пропан, следы бутилена. В песчанике обнаружен пентан, а в аргиллите – гелий. Содержание сульфатов (SO_4^{2-}) и сульфидов в керне аргиллита составило 0,16 и 0,01 % соответственно, концентрация сульфатов в песчанике – 0,01%, сульфиды не обнаружены.

В основу изучения подземной биосферы в осадочных породах, вскрытых ВПС-1, положили выявление в составе биоценозов песчаника и аргиллита доминантных эколого-трофических групп микроорганизмов цикла углерода. Методика включала: 1) реконструкцию таксономического состава микробиоценозов кернов песчаника и аргиллита, вскрытых ВПС-1, на основе анализа жирнокислотных (ЖК) биомаркеров в липидных профилях пород; 2) выявление у представителей реконструированных биоценозов потенциальных свойств, связанных со способностью преобразовывать углеродсодержащие соединения в экологических условиях исследуемых горизонтов и объединение их в эколого-трофические группы; 3) выделение культивируемых микроорганизмов путем посева кернов пород в селективные питательные среды; 4) первичная идентификация полученных изолятов микроорганизмов и изучение их адаптивных свойств; 5) сопоставление данных по численности и биоразнообразию культивируемых микроорганизмов с результатами

реконструкции микробоценозов; б) конструирование схемы функционирования микробного сообщества, участвующего в цикле углерода в осадочных породах венда Московской синеклизы, вскрытых ВПС-1.

Керн при подготовке к исследованию дробили и растирали до порошкообразного состояния, предварительно удалив верхние 2,5 см, с соблюдением правил стерильности. Породу в виде порошка использовали для выявления ЖК маркеров и микробиологического анализа. В последнем случае осуществляли десорбцию микроорганизмов с частиц породы растиранием порошка керна в 0,2 М растворе КОН (Кузнецов и др., 1963).

Реконструкцию биоценоза на основе анализа биомаркеров в липидном профиле породы осуществляли согласно ранее описанному алгоритму (Осипов, Турова, 1997) с помощью различных баз данных о липидных профилях нескольких сотен чистых культур известных бактерий. Липидные профили снимали методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на хромато-масс-спектрометре AT-5971 (США).

Для выделения из проб песчаника и аргиллита микроорганизмов разных эколого-трофических групп применяли питательные среды, в состав которых включали источники углерода и энергии, имеющие абиогенное и биогенное происхождение в исследуемых горизонтах. Подбор элективных сред осуществляли, если не указано иначе, согласно рекомендациям (Кузнецов, Дубинина, 1989). Для выделения водородокисляющих бактерий (ВОБ) применяли среду Шлегеля в атмосфере $O_2:CO_2:H_2$ (5:10:85); автотрофных метанобразующих бактерий (АМБ) – среду Беляева в атмосфере $H_2:CO_2$ (80:20); гетеротрофных (ацетокластических) метанобразующих бактерий (ГМБ) – среду Беляева с ацетатом натрия и H_2 в газовой фазе (Назина и др., 1998); автотрофных ацетогенов – среду Пфеннига в атмосфере $H_2:CO_2$ (80:20) (Деткова, 2003); автотрофных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) – среду Сорокина в атмосфере воздуха (1/3) и H_2 (2/3); гетеротрофных СРБ – среду Баарса с лактатом, либо ацетатом, натрия; алканотрофов – среду Бушнелла-Хааса, видоизмененный агар Чапека с РПА, разбавленным 1:10 (Методы ..., 1991), и среду Мюнца, – в атмосфере пропана и бутана, а также среду Буш-

нелла-Хааса с 2%-м гексадеканом (Eriksson et al., 2000); метанолюкисляющих бактерий (МОБ) – среду Виттенбари; аэробных целлюлозоразлагающих бактерий (ЦРБ) – минеральную среду с полосками фильтровальной бумаги либо микрокристаллической целлюлозой (Мельников и др., 2005); анаэробных ЦРБ – среды для мезофильных и термофильных ЦРБ по Егорову (Практикум ..., 1976); бродильщиков – углеводо-пептонную среду; олиготрофов – РПБ, разбавленный 1:10 (РПБр), среду M2 (Hottes et al., 2004) с глюкозой в концентрации 0,2 г/л – M2(0,2) и 0,02 г/л – M2(0,02), среду R2A (Defives et al., 1999); копиотрофов – РПБ, РПА, среду M2 с глюкозой в концентрации 2 г/л – M2(2). Концентрацию метана в газовой фазе флаконов определяли на газовом хроматографе Chrom-41 с пламенно-ионизационным детектором. Компонентный состав летучих ЖК в культурах автотрофных ацетогенов идентифицировали на газовом хроматографе Hewlett Packard 5880 (США).

Численность бактерий большинства изученных групп определяли методом предельных десятикратных разведений в 3-х-кратной повторности, определяя наиболее вероятное число по таблицам Мак-Креди. Численность МОБ определяли с помощью чашечного посева по Коху.

Посевы инкубировали при температуре горизонта – 37 °С, – для выделения «аборигенных» микроорганизмов. Поскольку при 37 °С растут и мезофилы и термофилы, для выявления различных температурных групп микроорганизмов проводили инкубацию посевов при 28 и 60 °С.

Микробные изоляты в виде отдельных колоний получали по стандартным методикам на агаризованных питательных средах. Первичную идентификацию изолятов осуществляли на основе изучения фенотипических и хемотаксономических свойств. Морфологию клеток определяли с применением микроскопа Биолам, увеличение 10×1,0×100. Физиолого-биохимические свойства изучали согласно (Практикум ..., 1976). Липидные профили чистых культур бактерий получали по методике (Stead et al., 1992) и анализировали на хроматографе Microbial Identification System (Sherlock), США.

В качестве адаптивных свойств выделенных микроорганизмов изучали способности к азотфиксации, к росту при температуре *in situ* (37 °С); исполь-

зовать в качестве единственного источника углерода и энергии органические субстраты: 1) глюкозу – ключевое соединение многих метаболических путей микроорганизмов; 2) пропан, бутан и гексадекан – углеводороды флюидов в порах исследуемых пород; 3) микробные метаболиты: метанол и этанол – продукты процессов брожения и бактериального окисления некоторых углеводов; ацетат в виде соли натрия – продукт ацетогенов, в том числе, и броодильщиков; 4) растворитель «Нефрас» (ГОСТ 3134-78) и керосин осветительный – техногенные смеси углеводородов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ биомаркеров в липидных профилях кернов осадочных пород, вскрытых ВПС-1

Анализ липидных профилей кернов песчаника и аргиллита показал, что их постоянными компонентами были биомаркеры бактерий, грибов и в-ситостерол растений, а в аргиллите, кроме того, был найден пальмитиновый альдегид (16a) – специфический маркер простейших (рис. 1).

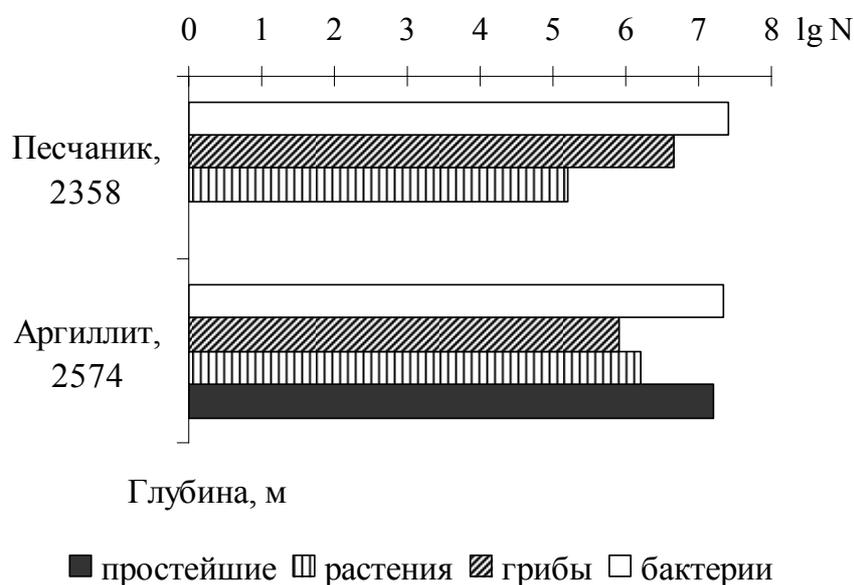


Рис. 1. Структура микробных сообществ осадочных пород, вскрытых ВПС-1

Анализ липидных профилей дает информацию о присутствии в образце породы биомаркеров, как жизнеспособных культивируемых и некультивируемых микроорганизмов, так и нежизнеспособных (мертвых). Можно полагать, что эукариотные биомаркеры в липидных профилях пород являются компонентами мертвых клеток микроорганизмов, за исключением грибов,

что согласуется с присутствием в породах водорослевого и сапропелевого детрита. Основным предметом нашего интереса являлись бактерии как наиболее вероятные участники процессов цикла углерода в подземной среде. Состав реконструированного бактериоценоза песчаника насчитывал 18 таксонов против двадцати трех аргиллита (табл. 1).

В бактериоценозах каждой из пород грамположительные бактерии (№п/п 13–30) доминировали над грамотрицательными (№п/п 1–12): в песчанике первые были представлены десятью таксонами, а их массовая доля (м.д.) составила 81,87%, в аргиллите – пятнадцатью таксонами и 92,78% соответственно. Среди грамположительных преобладали неспорообразующие бактерии: их м.д. в обеих породах находилась на уровне 59% от всех членов сообщества. В этой группе в бактериоценозе песчаника доминировал р. *Rhodococcus* (40,9%), в аргиллите – р. *Corynebacterium* (21,4%). Доля спорообразующих анаэробных бактерий (р. *Clostridium*) равнялась 20,3 и 25,6%, а факультативно-анаэробных (р. *Bacillus*) 2,55 и 7,9%, в песчанике и аргиллите соответственно. Исходя из содержания биомаркеров, количество бактерий в обеих осадочных породах находилось на одном уровне – 10^7 усл.кл/г породы. Проанализировав потенциальные свойства у представителей бактериоценозов песчаника и аргиллита, связанные с трансформацией CO_2 и органических соединений, в структуре сообществ пород мы выделили 7 эколого-трофических групп микроорганизмов: ВОБ, гомоацетогены, СРБ, МОБ, углеводородокисляющих бактерий (УОБ), ЦРБ, бродильщики.

В реконструированном бактериоценозе песчаника по массовой доле доминировали группы ВОБ, МОБ и УОБ: их м.д. находились в пределах 61,5 – 64,5% (рис. 2А). В аргиллите на первом месте были потенциальные бродильщики (м.д. 78%), на втором – УОБ (м.д. 66%) (рис. 2Б). Однако, по количеству таксонов, доминировали УОБ: 66,7% от всех родов в песчанике, 60,9% – в аргиллите.

2. Численность культивируемых микроорганизмов

Результаты высева кернов пород в селективные среды (табл. 2) подтвердили активность шести эколого-трофических групп, выделенных на основе маркерного анализа.

Таблица 1.

Структура бактериоценозов (%), реконструированных на основе анализа биомаркеров в липидных профилях пород, вскрытых ВПС-1

№ п/п	Группы бактерий	2358 м	2574 м	Функциональные способности
1.	<i>p. Acetobacter</i>	4,6	2,0	МОБ
2.	<i>p. Acinetobacter</i>	–	0,1	УОБ; ВОБ
3.	<i>p. Agrobacterium</i>	–	0,4	ЦРБ
4.	<i>p. Pseudomonas</i>	1,7	–	УОБ; ВОБ; МОБ; ЦРБ
5.	<i>p. Sphingobacterium</i>	0,1	–	УОБ
6.	<i>p. Sphingomonas</i>	1,2	0,1	УОБ; ЦРБ
7.	сем. Enterobacteriaceae	0,5	–	УОБ; ВОБ; бродильщики
8.	<i>p. Bacteroides</i>	0,8	–	ЦРБ; бродильщики
9.	<i>p. Wolinella</i>	4,7	0,5	ВОБ
10.	<i>p. Desulfovibrio</i>	–	0,2	СРБ; бродильщики
11.	<i>p. Nitrobacter</i>	4,4	0,1	ВОБ; МОБ
12.	<i>p. Caulobacter</i>	–	3,8	УОБ; МОБ; ЦРБ
13.	<i>p. Bacillus</i>	2,5	7,9	УОБ; ВОБ; МОБ; ЦРБ; бродильщики
14.	<i>p. Clostridium</i>	20,3	25,6	ЦРБ; бродильщики; гомоацетогены
15.	<i>p. Micrococcus</i>	2,2	–	УОБ; ВОБ; МОБ; ЦРБ
16.	<i>p. Staphylococcus</i>	–	1,8	УОБ; ЦРБ; бродильщики
17.	<i>p. Actinomyces</i>	–	10,7	УОБ; ЦРБ; бродильщики
18.	<i>p. Bifidobacterium</i>	–	0,01	бродильщики
19.	<i>p. Butyrivibrio</i>	0,6	1,0	ЦРБ; бродильщики
20.	<i>p. Cellulomonas</i>	2,5	–	УОБ; ЦРБ; бродильщики
21.	<i>p. Corynebacterium</i>	2,9	21,4	УОБ; МОБ; бродильщики
22.	<i>p. Eubacterium</i>	–	4,2	ЦРБ; бродильщики; гомоацетогены
23.	<i>p. Propionibacterium</i>	–	2,2	УОБ; бродильщики
24.	<i>p. Mycobacterium</i>	4,5	0,9	УОБ; ВОБ; МОБ
25.	<i>p. Nocardia</i>	–	3,2	УОБ; ВОБ; МОБ
26.	<i>p. Rhodococcus</i>	40,9	7,0	УОБ; ВОБ; МОБ
27.	<i>p. Pseudonocardia</i>	4,2	2,4	УОБ; ЦРБ
28.	<i>p. Micromonospora</i>	–	3,1	УОБ; ЦРБ; бродильщики
29.	<i>p. Streptomyces</i>	–	1,4	УОБ; МОБ; ЦРБ

30.	<i>p. Actinomadura</i>	1,3	–	УОБ; ЦРБ
Итого, усл. кл/г породы		$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	

Примечание: здесь и далее: 2358 м – песчаник; 2574 м – аргиллит; сокращения названий эколого-трофических групп бактерий в тексте

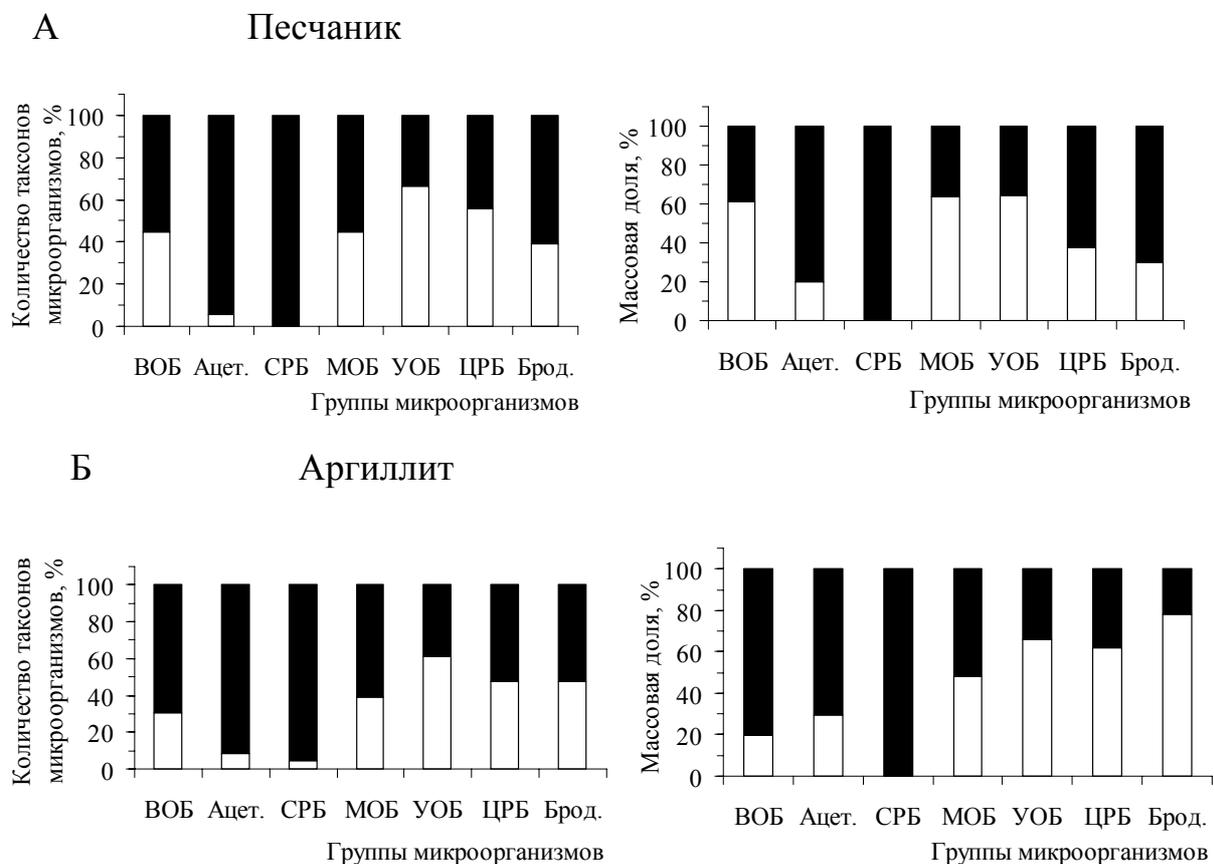


Рис. 2. Эколого-трофические группы микроорганизмов в реконструированных бактериоценозах песчаника (А) и аргиллита (Б)

Культивируемых ацетогенов не обнаружили в пробах обеих пород. Культивируемые СРБ были выделены только из образца аргиллита на среде для автотрофов, и лишь при температуре *in situ* (37 °С). Этот факт подтвердил результаты анализа липидных профилей пород (табл. 1): биомаркеры СРБ *p. Desulfovibrio* обнаружили только в керне аргиллита. Кроме того, исключительно в аргиллите присутствовали сульфиды – продукты жизнедеятельности СРБ, – тогда как сульфаты (акцепторы электронов для СРБ) были

в обеих породах. Культивируемые ЦРБ были выделены исключительно из пробы песчаника, и лишь в среде для аэробов (табл. 2), что, как мы полагаем, обусловлено активностью аэробных бактерий р. *Cellulomonas*, биомаркеры которых присутствовали в липидном профиле указанной породы (табл. 1).

Таблица 2.

Численность микроорганизмов, выделенных из кернов осадочных пород, вскрытых ВПС-1, кл/г породы

Группы микроорганизмов		Источник выделения, глубина залегания, м						
		Песчаник, 2358-2363 м			Аргиллит, 2574-2580 м			
		Температура, °С						
		28	37	60	28	37	60	
Используют углерод флюидов	ВОБ	$4,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^2$	$9,0 \times 10^{-1}$ (следы)	$4,0 \times 10^0$	$4,5 \times 10^1$	–	
	Автотрофные метаногены	$3,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^0$	–	$4,0 \times 10^{-1}$ (следы)	–	
	Ацетокластические метаногены	$2,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^0$	$9,0 \times 10^{-1}$ (следы)	$4,0 \times 10^{-1}$ (следы)	$9,0 \times 10^{-1}$ (следы)	
	Ацетогены	н/о	–	н/о	н/о	–	н/о	
	Автотрофные СРБ	–	–	–	–	$9,0 \times 10^0$	–	
	Гетеротрофные СРБ	–	–	–	–	–	–	
	МОБ	$3,0 \times 10^0$	$9,5 \times 10^0$	$1,1 \times 10^1$	$1,5 \times 10^0$	$2,0 \times 10^0$	–	
	Алканотрофы: в атмосфере пропана и бутана; на гексадекане	$4,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	–	
	$7,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^1$		
Используют углерод РОВ	ЦРБ	–	$9,0 \times 10^{-1}$ (следы)	–	–	–	–	
	Бродильщики	$2,5 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$9,5 \times 10^1$	
	Олиготрофы: РПБр	M2(0,2)	$9,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$9,5 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
		M2(0,02)	$9,5 \times 10^1$	$9,5 \times 10^4$	$9,7 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1$	$9,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
		R2A	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^0$	$7,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
			$6,5 \times 10^1$	$7,5 \times 10^4$	$1,15 \times 10^3$	$9,5 \times 10^0$	$6,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
	Копиотрофы: РПБ	M2(2)	$5,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
		$2,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$9,5 \times 10^1$	

Примечание: «–» – отсутствие видимых признаков роста; н/о – не определяли; сокращения названий питательных сред в тексте

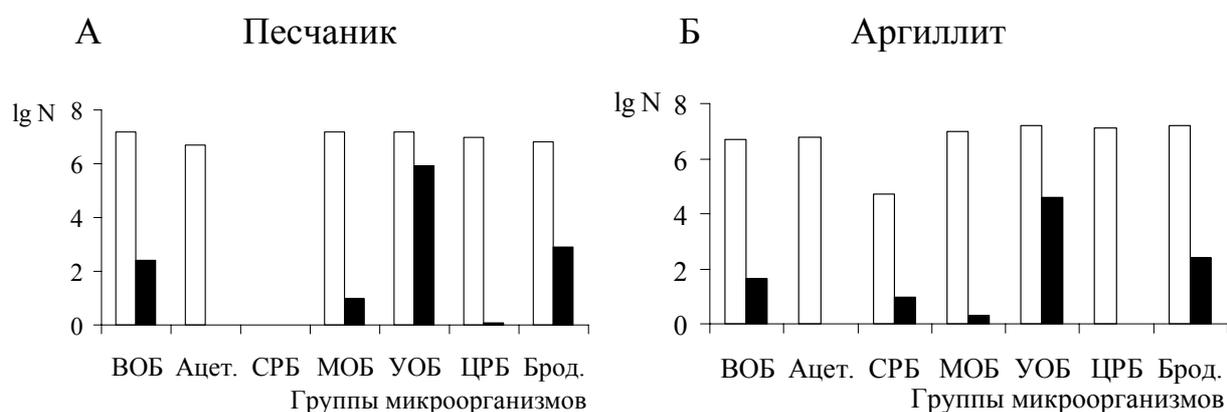
Путем высева кернов в питательные среды были выявлены три эколого-трофические группы, которые невозможно выделить на основе маркерного анализа пород. Во-первых, особенности хроматографа не позволили провести учет биомаркеров метаногенов в липидных профилях пород. Однако в породах песчаника и аргиллита был метан – продукт их жизнедеятельности, – а также CO_2 и H_2 – ростовые субстраты, и потому мы сочли метаногенов одной из основных эколого-трофических групп в биоценозах исследуемых пород. Во-вторых, с учетом концепции подземной биосферы Верховцевой и соавт. (1996), мы выделили еще две группы микроорганизмов: окисляющих органический субстрат до CO_2 и H_2O при его высоких концентрациях в среде – копиотрофов – и, очень низких, – олиготрофов.

При высеве образцов пород в питательные среды при 28, 37 и 60 °C были зафиксированы разные распределения численности микроорганизмов эколого-трофических групп. Характер зависимости численности (N) от температуры у большинства выделенных групп – с максимальным значением при 37 °C – соответствовал ожидаемому результату опытов по выделению микроорганизмов – «аборигенов» исследуемых пород. Указанную закономерность наблюдали для ВОб, АМБ, СРБ, ГОБ, ЦРБ, а также олиготрофов на M2(0,2) и R2A, песчаника и аргиллита. Кроме того, она была характерна для копиотрофов на M2(2) и ГМБ – только песчаника, а также ПБОб, МОБ и олиготрофов на M2(0,02) – исключительно аргиллита. Численность копиотрофов на РПБ, как и $N_{\text{Брод.}}$, были тем меньше, чем выше была температура, что может говорить об их наземном происхождении.

За исключением $N_{\text{коп.}}$ на РПБ при 37 °C, а также $N_{\text{Брод.}}$ при 60 °C, численность микроорганизмов каждой группы, изолированной из песчаника, была выше, чем таковая – аргиллита. Полученное соотношение согласуется с флюидопроницаемостью пород: пористость (21,2%) и газопроницаемость (49,60 мД) песчаника были больше, чем аналогичные параметры аргиллита: 5,9% и 5,62 мД. $N_{\text{коп.}}$ обеих пород при 37 °C находилась на одном уровне: $9,0 \times 10^2$ и $9,5 \times 10^2$ кл/г соответственно, что, в свою очередь, согласуется с содержанием $C_{\text{орг.}}$ в породе: в песчанике и аргиллите оно было близко – 0,12 и

0,15% на породу соответственно. $N_{\text{Брод.}}$ песчаника при 60 °С – $4,5 \times 10^1$ кл/г – была незначительно ниже, чем $N_{\text{Брод.}}$ аргиллита при аналогичной температуре – $9,5 \times 10^1$ кл/г. Можно полагать, что бродильщики аргиллита более адаптированы к высоким температурам, чем аналогичные бактерии песчаника.

Среди всех групп микроорганизмов, изолированных из кернов обеих пород, максимальная численность – $7,5 \times 10^5$ кл/г породы – принадлежала алканотрофам песчаника при температуре *in situ*. Наибольшая численность среди микроорганизмов аргиллита, также принадлежала алканотрофам при 37 °С и равнялась $4,0 \times 10^4$ кл/г. Доминирующее положение алканотрофов подтверждает и тот факт, что доля культивируемых при 37 °С УОБ, как песчаника (5%), так и аргиллита (0,3%), была максимальной, по сравнению с остальными группами микроорганизмов (рис. 3).



- рассчитанная на основе анализа биомаркеров в липидных профилях пород
- определенная методом высева керна в лабораторные среды при 37 °С

Рис. 3. Численность микроорганизмов эколого-трофических групп песчаника (А) и аргиллита (Б)

В порядке убывания численности, группы культивируемых при температуре *in situ* микроорганизмов, как песчаника, так и аргиллита, располагались в ряд: алканотрофы > олиготрофы > копитрофы > бродильщики > ВОБ > МОБ > метаногены. Численность СРБ, изолированных лишь из аргиллита, была близка $N_{\text{МОБ}}$ обеих пород – порядка 10^0 кл/г. ЦРБ в песчанике и метаногены в аргиллите обнаружены в следовых количествах. В общем, ЦРБ являются минорным компонентом исследуемых пород, что согласуется с гео-

химической обстановкой: целлюлоза – ростовой субстрат для ЦРБ – присутствует в породах в остаточном количестве.

Значения интенсивности метаногенеза в образцах песчаника и аргиллита свидетельствуют об аборигенности выделенных метаногенов. Интенсивность гетеротрофного метаногенеза в песчанике при 28, 37 и 60 °С находилась примерно в одном диапазоне величин: 0,02–0,092 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3 \times 30$ сут. Максимальное ее значение – 0,092 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3 \times 30$ сут – зафиксировали при температуре *in situ*. Активность АМБ аргиллита была выявлена только при 37 °С на уровне 0,070 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3 \times 30$ сут. Активность АМБ песчаника, а также ГМБ аргиллита, была тем больше, чем выше была температура выделения. Для АМБ она в целом варьировала в пределах от 0,030 до 0,160, для ГМБ – от 0,019 до 0,152 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3 \times 30$ сут. Таким образом, метаногены песчаника и аргиллита адаптированы, как к температуре горизонта – 37 °С, – так и к более высоким температурам, вплоть до 60 °С.

3. Характеристика и оценка адаптивных свойств изолятов культивируемых микроорганизмов

Из образца песчаника было выделено 70 изолятов микроорганизмов в виде колоний на агаризованных средах, из пробы аргиллита – 43 изолята. Среди них, одна культура, изолированная из пробы аргиллита, содержала грамотрицательные палочки, 62 культуры песчаника и 35 – аргиллита – грамположительные спорообразующие палочки. Один изолят песчаника был представлен грамположительными кокками, 7 изолятов песчаника и 8 – аргиллита – грамположительными неспорообразующими палочками.

По способности пересеваться на свежую питательную среду, все изоляты, выделенные из обеих пород, поделили на 3 группы: 1) многократно пересеваемые – большая часть изолятов (96 культур), бактерии в которых являлись спорообразующими палочками, и два штамма неспорообразующих бактерий; 2) плохо пересеваемые – 4 изолята, представленные бесспоровыми палочками; 3) совсем непересеваемые – 11 изолятов неспорообразующих и один – спорообразующих – палочковидных бактерий. Этот факт свидетельствует о неполноте наших знаний о специфических пищевых потребностях

микроорганизмов в условиях подземной среды, а, в целом, это обстоятельство часто сопровождает работу по выделению культивируемых микроорганизмов из природной среды (Андреева и др., 2001; Cho, Giovannoni, 2004). В реконструированных бактериоценозах песчаника и аргиллита доминировали грамположительные неспорообразующие бактерии. Поэтому мы провели идентификацию пересеваемых штаммов неспорообразующих бактерий, изолированных из кернов обеих пород. По липидным профилям и фенотипическим признакам культуры ГП1 и МП2, изолированные из песчаника, были предварительно отнесены к группе нокардиоформных актиномицетов и р. *Corynebacterium* соответственно, а шт. ГА6, выделенный из аргиллита, – к р. *Propionibacterium*. ЖК маркеры указанных таксонов присутствовали в липидных профилях соответствующих пород. Не удалось идентифицировать шт. ПК37.4, представленный кокками, и шт. ГА2, содержащий грамотрицательные палочки. Этот факт свидетельствует о присутствии в подземной биосфере микроорганизмов, которые не имеют аналогов среди бактерий, изолированных ранее из почвы и наземных сред обитания.

Все изоляты, независимо от температуры выделения, были способны к росту при 37 °С, что свидетельствует об их адаптации температурным условиям исследуемых горизонтов. За исключением шт. ПК60.1, все изоляты песчаника и аргиллита, могли фиксировать N₂, что важно, поскольку отсутствие связанного азота считают фактором, лимитирующим функционирование подземных экосистем (Оборин и др., 2004).

Все культуры микроорганизмов, изолированные из пород, могли потреблять глюкозу и пропаново-бутановую смесь в качестве единственного источника углерода и энергии. За исключением 33% олиготрофных и 9% копиотрофных изолятов песчаника, полученных при 28 °С, все культуры микроорганизмов были способны использовать гексадекан. Среди мезофильных изолятов песчаника все предложенные субстраты: глюкозу, пропан и бутан, гексадекан, керосин, растворитель (далее – смесь углеводородов), метанол, этанол, а также ацетат натрия, – потребляли 100% гексадеканокисляющих культур, выделенных при 28 и 37 °С, и копиотрофных – при 37 °С. Анало-

гичными свойствами обладали 100% изолятов аргиллита: пропан-бутаноокисляющих – выделенных при 28 °С, олиготрофных и копиотрофных – при 37 °С. Способность использовать предложенные субстраты была наиболее высокой у гексадеканокисляющих изолятов песчаника.

Четыре алканотрофных, 17 олиготрофных и 11 копиотрофных изолятов, выделенных из обеих пород, одновременно со спорообразующими бактериями содержали дрожжи. Количество таких смешанных культур, как и содержание биомаркера грибов – линолевой кислоты (18:2) – было больше в песчанике (26 изолятов и 346 нг/г), по сравнению с аргиллитом (6 изолятов и 175 нг/г). Сопоставляя способность изолятов использовать 8 органических субстратов, было установлено, что у смешанных культур (СК) она была выше, чем у чистых (ЧК). Например, среди пропан-бутаноокисляющих изолятов, выделенных из обеих пород при 37 °С, несмотря на то, что все культуры использовали 6 субстратов, смесь УВ потребляли 40% ЧК и 100% СК, а керосин – 60 и 75% соответственно. Кроме того, все олиготрофные культуры, изолированные из песчаника и аргиллита при 37 °С, росли в атмосфере пропана и бутана, на смеси УВ, керосине и глюкозе. Гексадекан и этанол использовали 100% СК и лишь 83 и 67% ЧК, соответственно; метанол и этанол потребляли 90,9% СК и только 83% ЧК. Можно полагать, что дрожжи имеют большое значение для существования бактерий в исследуемых осадочных породах. Известно, что дрожжи способны утилизировать большой спектр органических субстратов, в том числе вещества, присутствующие в исследуемых породах *in situ* – спирты и *n*-алканы (Кузнецов, Дубинина, 1989; Бабьева, Чернов, 2004; Shmitz et al., 2000). Продукты их метаболизма – летучие ЖК, высшие спирты и др., могут быть источниками питания для сопутствующих микроорганизмов. Дрожжи также могут повышать азотфиксирующую способность бактерий (Бабьева, Чернов, 2004). Олиготрофные СК не удалось разделить на отдельные штаммы бактерий и дрожжей. Возможно, они являются синтрофными группировками.

Таким образом, в исследованных осадочных породах наиболее жизнеспособными являются грамположительные спорообразующие палочковид-

ные бактерии. Они не являются специалистами по отношению к источникам углерода и обладают рядом адаптивных свойств для выживания в подземной среде: способностью к азотфиксации, росту при температуре пласта, спорообразованию. Они могут развиваться за счет использования веществ, присутствующих в породах *in situ*: углеводородов, спиртов, ацетата. Некоторые из этих бактерий получают дополнительные питательные вещества – экзометаболиты дрожжей, – с которыми они образуют ассоциации.

4. Схема цикла углерода в осадочных породах, вскрытых ВПС-1

Первичными продуцентами в экосистемах осадочных пород, вскрытых ВПС-1, и представленных песчаником и аргиллитом, могут быть автотрофные метаногены и СРБ, способные получать энергию и наращивать свою биомассу за счет веществ, присутствующих в исследуемых горизонтах – CO_2 , H_2 , SO_4^{2-} (Pedersen, 1997) – а также ВОБ, использующие CO_2 , H_2 и O_2 (Кузнецов, Дубинина, 1989).

В начале пищевой цепочки стоят и алканотрофы, которые образуют органическое вещество (ОВ) за счет углеводородов (Оборин и др., 2004). Наличие акцептора электронов для аэробных микроорганизмов – O_2 – в породах глубоких горизонтов можно объяснить поступлением его из оксидов (Gold, 1992), притоком из вышележащих горизонтов и радиолизом воды (Гуцало, 1974; Onstott et al., 2003). Алканотрофы не только ассимилируют недоступный другим микроорганизмам субстрат, но и могут поставлять, в качестве экзометаболитов CO_2 , аминокислоты, а при лизисе клеток все необходимые для роста гетеротрофов компоненты – аминокислоты, пептиды, липиды, углеводы (Оборин и др., 2004). При недостатке кислорода разложение алифатических углеводородов бактериями сопровождается накоплением промежуточных продуктов – жирных кислот, начиная с пропионовой (Ившина и др., 1987). Экзометаболит УОБ метанол может служить ростовым субстратом для анаэробных гетеротрофных метаногенов (Заварзин, Колотилова, 2001). Все продукты жизнедеятельности УОБ могут быть использованы анаэробными бродильщиками (Кузнецов, Дубинина, 1989).

Субстратом для брожения может быть и некоторая часть автохтонного ОВ, в том числе продукты лизиса клеток микроорганизмов и продукты бактериального гидролиза целлюлозы, входящей в РОВ пород. Такие продукты брожения, как спирты, ацетат и другие ЖК, в присутствии O_2 окисляются аэробными гетеротрофами (олиготрофами, копиотрофами, МОБ) до CO_2 и H_2O . В аэробных же условиях микробные экзометаболиты CO_2 и H_2 , наряду с ювенильными, могут использоваться ВОБ.

В анаэробных условиях биогенные CO_2 и H_2 , также как и абиогенные, потребляются автотрофными метаногенами, выявленными в кернах обеих пород, а также СРБ аргиллита при использовании сульфатов. H_2 различного происхождения, вместе с ацетатом или метанолом, может быть ростовым субстратом для гетеротрофных метаногенов (Кузнецов, Дубинина, 1989).

H_2 присутствует в порах песчаника, но отсутствует в порах аргиллита. Таким образом, в поровое пространство более проницаемого песчаника поступает больше ювенильного и биогенного H_2 , чем в поры плотного аргиллита, где H_2 полностью утилизируется гидрогенотрофными бактериями. Их численность в песчанике выше, чем в аргиллите. Можно полагать, что именно поступление H_2 определяет развитие и, следовательно, конкуренцию, значительной части микроорганизмов, получающих энергию при использовании флюидов в исследованных породах: водородных бактерий, метаногенов, сульфатредукторов и ацетогенов.

В каждом биоценозе (Заварзин, 2004) формируется трофическая сеть, представленная уравновешенными ветвями продуцентов и деструкторов. Условием устойчивости сообщества является определенная степень замкнутости циклов биогенных элементов, что позволит ему существовать неопределенно долго за счет поступающей извне энергии. Определяющий фактор автономности подземных экосистем (Morita, 2000; Pedersen, 1997) – это возможность микробиоты осуществлять первичную продукцию *in situ*, т. е. не зависимо от процессов фотосинтеза. В песчанике и аргиллите, вскрытых ВПС-1, есть, как продуценты, так и гетеротрофные микроорганизмы, способные использовать РОВ и микробные экзометаболиты. Таким образом, в

осадочных породах венда Московской синеклизы, присутствуют микроорганизмы, обладающие адаптивными свойствами для существования в подземной среде. Их биогеохимическая активность способствует функционированию в настоящее время цикла углерода, который во многом определяется параметрами флюидопроницаемости пород.

Выводы:

1. По результатам анализа биомаркеров в липидных профилях осадочных пород венда Московской синеклизы обнаружены эколого-трофические группы микроорганизмов цикла углерода. Они могут развиваться за счет углерода флюидов (водородные бактерии, метаногены, сульфатредукторы, метанооксиляющие бактерии, алканотрофы), либо за счет рассеянного органического вещества пород (целлюлозоразлагающие бактерии, бродильщики, олиготрофы, копиотрофы).

2. Доминирующую эколого-трофическую группу осадочных пород, вскрытых ВПС-1, по результатам посевов, составляют углеводородоксиляющие микроорганизмы. Культивируемые микроорганизмы в порядке убывания численности при температуре *in situ* располагаются в ряд: алканотрофы > олиготрофы > копиотрофы > бродильщики > водородные бактерии > метанооксиляющие бактерии > метаногены.

3. Наиболее адаптированными к условиям изученных глубоких горизонтов являются грамположительные спорообразующие палочковидные бактерии, способные к азотфиксации, росту при температуре пласта за счет использования присутствующих в породах abiогенных углеводородов, биогенных спиртов и ацетата. Некоторые из этих бактерий получают дополнительные питательные вещества за счет ассоциации с дрожжами.

4. Обнаружившие активность микроорганизмы могут осуществлять в изученных горизонтах цикл углерода за счет продуцентов (автотрофных метаногенов, сульфатредукторов, водородных бактерий и алканотрофов) и редуцентов (ацетокластических метаногенов, метанооксиляющих бактерий,

целлюлозоразлагающих бактерий, бродильщиков, олиготрофов, копиотрофов).

5. Основным фактором, определяющим интенсивность цикла углерода в исследуемых горизонтах, является флюидопроницаемость пород.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Шеховцова Н.В., Первушина К.А., Грибова И.С., Осипов Г.А. Микроорганизмы в осадочных породах, вскрытых Высоковской скважиной // Недр. Разведка и охрана недр. – 2007. – №4. – С. 49–51.

Другие научные работы:

2. Первушина К.А., Шеховцова Н.В. Об экологических особенностях микроорганизмов в породах глубоких горизонтов земной коры // Структура, вещество, история литосферы Тимано-Североуральского сегмента: Материалы XI науч. конф. – Сыктывкар, 2002. – С. 148–150.

3. Шеховцова Н.В., Первушина К.А. Об исследовании углеводородокисляющих микроорганизмов геологической среды Высоковской скважины // Биология, экология, химия, безопасность жизнедеятельности: Материалы всеросс. науч. конф. – Ярославль, 2003. – С. 46–49.

4. Первушина К.А., Шеховцова Н.В. Выделение углеводородокисляющих микроорганизмов из осадочных пород глубоких горизонтов земной коры // Структура, вещество, история литосферы Тимано-Североуральского сегмента: Материалы XII науч. конф. – Сыктывкар, 2003. – С. 200–202.

5. Первушина К.А., Кувшинова М.А., Шеховцова Н.В. Изучение алканотрофных микроорганизмов пород, вскрытых Высоковской скважиной // Биоразнообразие Верхневолжья: состояние и проблемы сохранения: Материалы науч.-практ. конф. – Ярославль, 2004. – С. 167–172.

6. Первушина К.А., Шеховцова Н.В., Кувшинова М.А. Подпочвенные экосистемы осадочных пород глубоких горизонтов земной коры // Эколого-

биологические проблемы бассейна Каспийского моря: Материалы VIII межд. науч. конф. – Астрахань: Астраханский ун-т, 2005. – С. 134–135.

7. Первушина К.А. Микроорганизмы цикла углерода в осадочных породах глубоких горизонтов земной коры // Рациональное природопользование: Материалы всеросс. конф. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – С. 152–156.

8. Первушина К.А., Кувшинова М.А., Шеховцова Н.В. Аэробные гетеротрофные микроорганизмы осадочных пород, вскрытых Высоковской скважиной // Современные проблемы биологии, экологии, химии: Сб. науч. тр. – Ярославль: ЯрГУ, 2005. – С. 30–34.

9. Первушина К.А., Шеховцова Н.В., Осипов Г.А. Изучение микроорганизмов, использующих газы в породах глубоких горизонтов стратисферы // Экологические проблемы уникальных природных и антропогенных ландшафтов: Материалы всеросс. науч. конф. – Ярославль: ЯрГУ, 2006. – С.182–188.

10. Первушина К.А., Шеховцова Н.В. Угледородокисляющие микроорганизмы в осадочных породах глубоких горизонтов земной коры // Наука. Образование. Молодежь: Материалы IV всеросс. науч. конф. – Майкоп: АГУ, 2007. – Часть 2. – С. 140–143.

11. Первушина К.А., Шеховцова Н.В., Новожилов В.Е., Осипов Г.А. Микроорганизмы цикла углерода в осадочных породах глубоких горизонтов земной коры в пределах Московской синеклизы // Современные направления теоретических и прикладных исследований '2007: Сб. науч. тр. по материалам межд. науч.-практ. конф. – Одесса: Черноморье, 2007. – Т. 20. Биология. Сельское хозяйство. – С. 14–22.