

ОЦЕНКА БИОГЕОХИМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОДЛЕДНИКОВОГО ОЗЕРА ВОСТОК, ВОСТОЧНАЯ АНТАРКТИДА, В ПЛАНЕ ПОДДЕРЖАНИЯ МИКРОБНОЙ ЖИЗНИ

С.А.БУЛАТ¹, И.А.АЛЕХИНА¹, Ж.Р.ПЕТИ², В.Я.ЛИПЕНКОВ³, В.В.ЛУКИН³

¹ – Петербургский институт ядерной физики РАН

² – Лаборатория гляциологии и геофизики окружающей среды, Гренобль, Франция

³ – ГНЦ РФ Арктический и антарктический научно-исследовательский институт

Задачей настоящего исследования было оценить микробное содержание в так называемом озерном льду, происходящем из замерзшей воды подледникового озера Восток, погребенного под 4-километровой шапкой Восточного Антарктического щита. Конечной целью проекта является обнаружение микробной жизни (открытие новых форм жизни) в этой экстремальной по условиям существования ледовой экосистеме. Главным методом исследования было обнаружение и идентификация молекул ДНК с учетом строгих правил работы с «древней» ДНК. Для подсчета клеточных популяций использовали проточную цитофлюорометрию.

В результате оба подхода показали, что лед озера Восток содержит крайне низкую неравномерно распределенную биомассу, что свидетельствует о том, что сама вода озера (по крайней мере, ее верхние слои), по-видимому, едва ли заселена микроорганизмами.

*Вплоть до настоящего времени исследование только озерного льда, содержащего глинисто-слябые включения, позволило обнаружить несколько бактериальных филотипов (видов). Среди них неожиданно оказались хемолитоавтотрофный термофил *Hydrogenophilus thermoluteolus* и дополнительно три неидентифицированных вида, все прошедшие множественные контроли на загрязнение чужеродной микрофлорой. Напротив, более глубокий и чистый озерный лед (без каких-либо седиментов) не показал ничего заслуживающего внимания. Исследование глубокого и древнего атмосферного льда (слои ледника прямо над озером) также не выявило никаких достоверных сигналов, что свидетельствует в пользу полной изоляции экосистемы озера Восток от поверхностной биоты по меньшей мере на протяжении последних 15 млн лет. Все эти находки и ожидания обсуждаются в контексте необычной биогеохимической среды озера Восток.*

Таким образом, вопрос о жизни в озере Восток остается пока открытым. В целом полученные результаты указывают, что поиск жизни в озере Восток сопряжен с очень высокой вероятностью загрязнения чужеродной микрофлорой. Само же подледниковое озеро Восток может рассматриваться как исключительно чистая (почти стерильная) гигантская водная система на Земле, которая могла бы служить в качестве уникальной испытательной площадки для отработки методов и инструментария для поиска внеземной жизни на ледовых планетах и лунах.

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), и поэтому возможность таких сред содержать микробную жизнь привлекает особое внимание. Из таких озер наиболее известным и изученным является крупнейшее подледниковое озеро Восток.

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

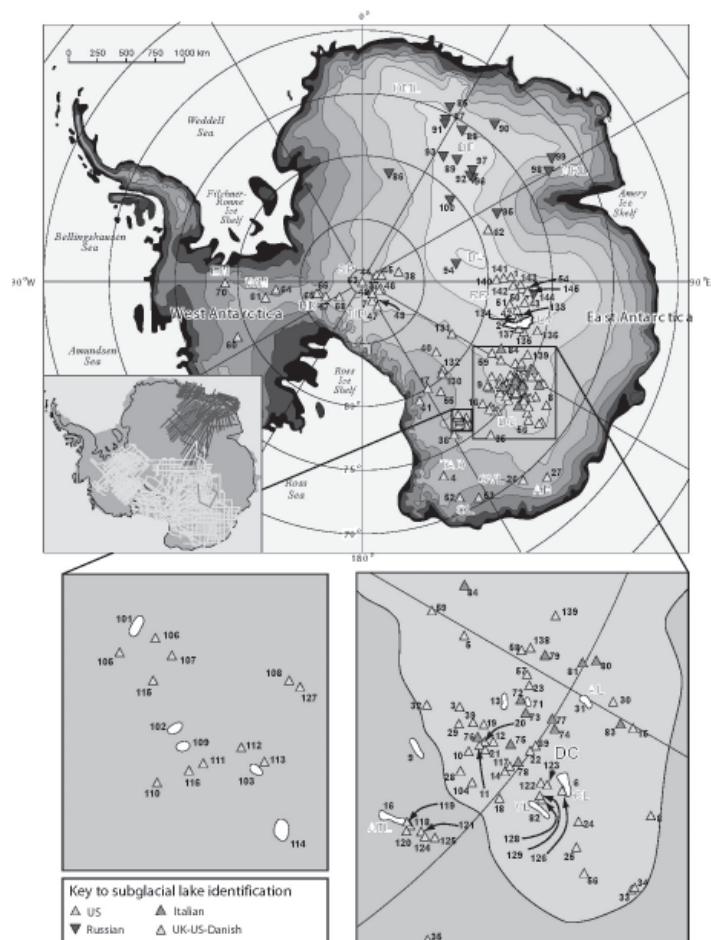


Рис.1. Подледниковые озера и другие водоемы, обнаруженные в Антарктиде по настоящее время методами дистанционного зондирования [10]

Задачей нашего исследования было оценить микробное содержание в озерном льду озера Восток, погребенном под 4-километровым Восточно-антарктическим ледовым панцирем [4]. 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 сверхизбытком 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 [12]. Оценку количества клеток осуществляли проточной цитофлуориметрией.

Озерный лед, полученный при глубоком бурении во льду на станции Восток [3] (рис. 2), на сегодняшний день представляет единственную и уникальную в своем

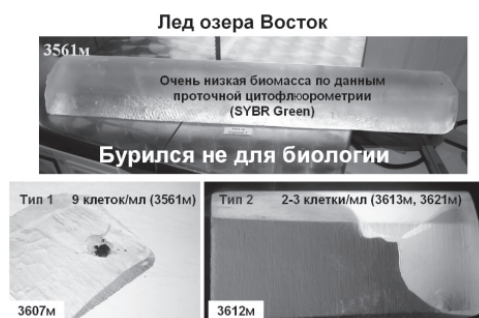


Рис. 2. Образцы озерного льда двух типов и содержание микробных клеток по данным проточной цитофлуориметрии

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. 3). Этот лед состоит из двух слоев. Верхний слой, так называемый первый тип льда, содержит мелкие (микронного размера) включения глинисто-сланцевых осадков и, как полагают, образуется над мелководным заливом, расположенным по линии тока льда по направлению к ст. Восток. Нижний, второй 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 первого типа является присутствие в нем как окисленных (в основном), так и восстановленных (в виде металл-сульфидов) соеди-

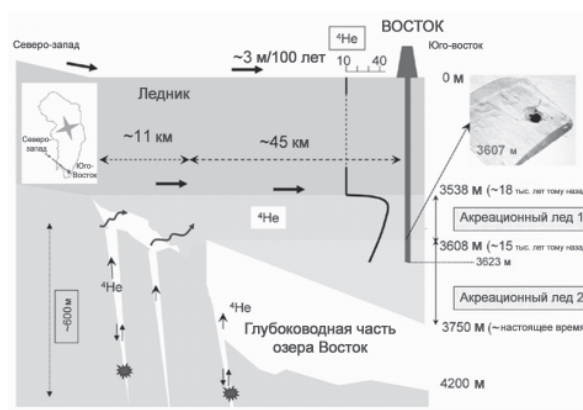


Рис. 3. Схема керна льда со станции Восток в поперечном разрезе озера Восток (ток льда слева направо)

нений 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 $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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.

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 первого типа с минеральными включениями) или воде озера, возможно обнаружение хемоавтотрофных пьезофильных психрофилов. 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 не изученного 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.

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 филоципов были вскрыты в образцах озерного льда первого типа, содержащего глинисто-слюдяные включения. В то же время тщательный, со всеми предосторожностями в плане контаминации анализ более глубокого, молодого и чистого озерного льда второго 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.

Бактериальные виды, обнаруженные во льду озера Восток

Лед Образец	Достоверные виды	Ближайший родственник
Тип 1		
3551	0	Термофил - 50 - 52°C
47м { 3561 (2 x)*	1	<i>H. thermoluteolus</i> (3 + 6** клона)
~5000 лет { 3593	0	
{ 3607 (3 x)	1	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> (12 клонов)
Тип 2		
3612	0	
3619 (3 x)	0	
3623	0	

* Повторности
**Celine Lavire/Philippe Normand (Лион, Франция)

Рис. 4. Термофильные бактерии, обнаруженные в озерном льду типа 1 [2, 6]

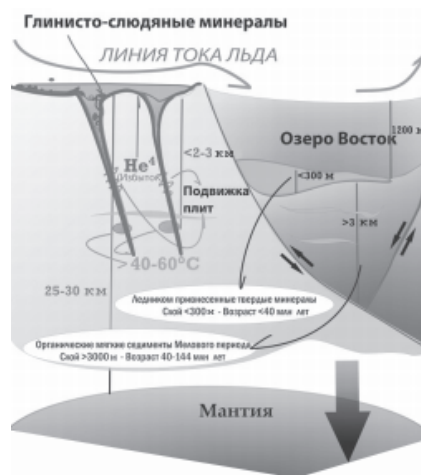


Рис. 5. Геотермальное окружение (среда) озера Восток (в его основании) и термофильные бактерии в озерном льду типа I

Среди находок в озерном льду первого типа отметим единственный организм, надежно идентифицированный по ДНК-сигналу, который оказался истинным термофилом и хемоавтотрофом бактерией *Hydrogenophilus thermoluteolus* [2] (рис. 4). Впервые эта бактерия была обнаружена в образце льда с глубины 3607 м [2], но в последующем была подтверждена в другом горизонте льда первого типа (3561 м) [6]. 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 первого типа, по всей видимости, обитают не в самой воде озера (температура $2^\circ\text{C} \div -3^\circ\text{C}$), а в его основании [2]. Было предположено, что они могут жить в относительно теплых ($40-60^\circ\text{C}$ 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 первого типа) в результате сейсмотектонической активности, периодически происходящей в районе озера Восток [11] (рис. 5). 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 желанным объектом для проникновения.

Имея в виду окислительно-восстановительные реакции, возможные в озерном льду первого 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 первого 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 элек-

тронной 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 [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 первого 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 – хемоавтоотрофная термофильная бактерия.

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 (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.

Выражаем благодарность Российской антарктической экспедиции и Санкт-Петербургскому государственному горному институту за образцы кернов льда Восток. Работа выполнена в рамках ФЦП «Мировой океан» (подпрограмма «Изучение и исследование Антарктики») и гранта РФФИ 05-05-66806-НЦНИЛ. Исследование также было поддержано ЕНИО «Восток» (GDRE «Vostok»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. 1. 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.

S.A.BULAT, I.A.ALEKHINA, J-R.PETIT, V.YA.LIPENKOV, V.V.LUKIN

BIOGEOCHEMICAL ASSESSMENT OF LIFE POTENTIAL OF SUBGLACIAL LAKE VOSTOK, EAST ANTARCTICA

The objective of the study was to estimate microbial content of accretion ice originating from the water of the subglacial Lake Vostok buried beneath 4-km thick East Antarctic ice sheet with the ultimate goal to discover microbial life in this extreme icy environment. The DNA study constrained by Ancient DNA research criteria was used as a main approach. The flow cytometry was implemented for cell counting.

As a result, both approaches showed that the Lake Vostok accretion ice contains the very low unevenly distributed biomass indicating that the water body (at least upper layer close to the ice-water boundary) should also be hosting a highly sparse life.

*Up to now, the only accretion ice featured by presence of mica-clay sediments allowed the recovery a few bacterial phylotypes. This unexpectedly included the chemolithoautotrophic thermophile *Hydrogenophilus thermoluteolus* and three more unclassified phylotypes all passing numerous contaminant controls. In contrast, the deeper and cleaner accretion ice with no sediments presence and near detection limit gas content gave no reliable signals. The deep glacial ice horizons just above the lake also showed no confident DNA signals, thus, serving a life-barrier between the Lake Vostok ecosystem and surface biota for at least 15 Ma. All these findings and farther (expectations) are discussed in terms of unusual biogeochemical environment of the lake.*

Thus, the question «Is there life and which life forms» remains to discover. In general, the results obtained testify that the search for life in the Lake Vostok is constrained by a high chance of forward-contamination. The subglacial Lake Vostok may be viewed as the only exceptionally clean (near-sterile) giant aquatic system on the Earth which could provide a unique test area for searching for life on icy planets and moons.