

УСТОЙЧИВОСТЬ СООБЩЕСТВ ЗЕМНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ФИЗИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПОДПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ МАРСА

**В.С. Чепцов, Е.А. Воробьева, Г.А. Осипов, С.А. Булат, М.В. Горленко,
Н.А. Манучарова., А.К. Павлов, М.А. Вдовина, В.Н. Ломасов**

**"Земля на ранних этапах развития солнечной планетной системы"
ГАИШ МГУ, 28-30 ноября 2016 г.**



СОВРЕМЕННЫЕ УСЛОВИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ МАРСА

**Низкие температуры (среднегодовая
температура около – 60 С)**

Низкое давление (5.4 мбар)

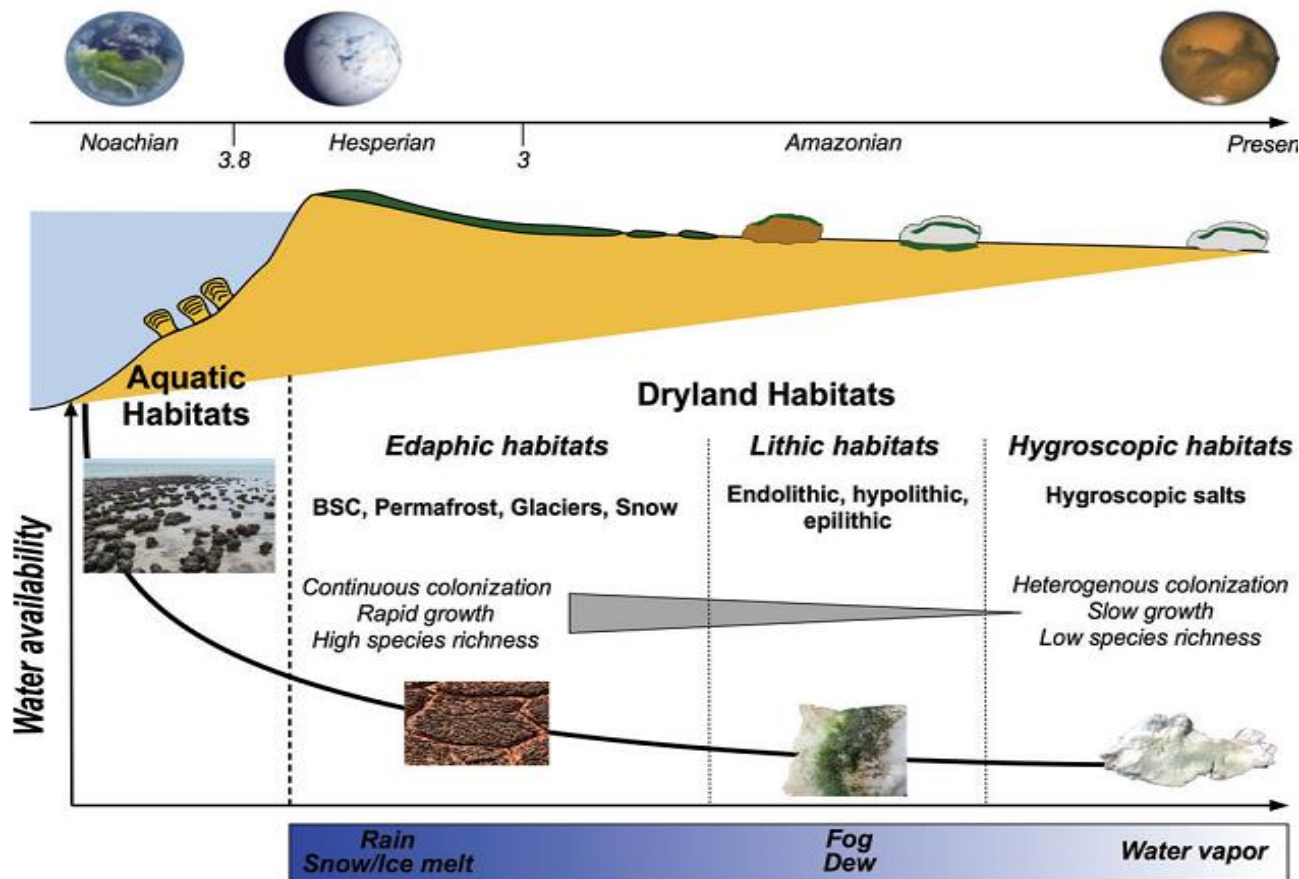
Углекислая атмосфера

Присутствие сильных окислителей

Интенсивное УФ-излучение

Ионизирующее излучение

Дефицит воды



Davila, Schulze-Makuch, 2016

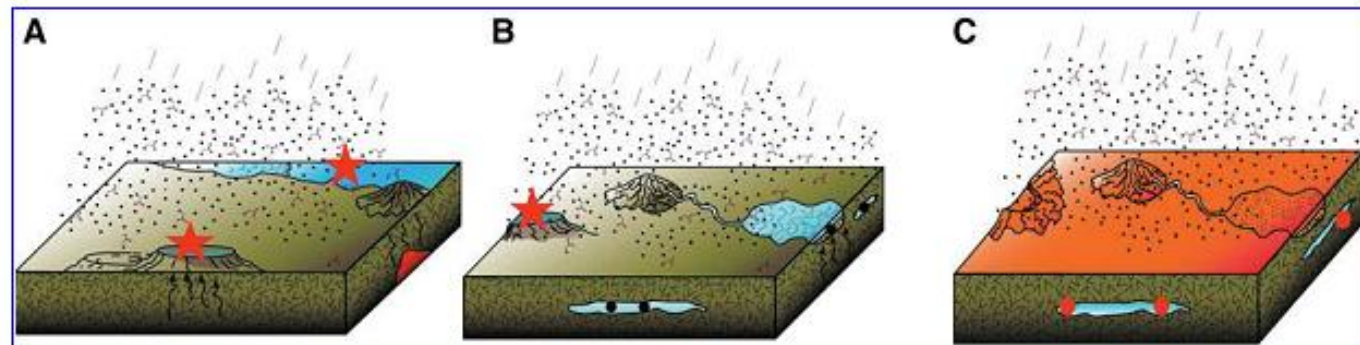


FIG. 3. Variable conditions favoring life on Mars. (A) Sketch representing early Mars with two types of unconnected habitable environments that could have supported the emergence of life (indicated by the red stars)—a lake in an impact crater and a larger water body. (B) Changing habitability on Mars. In one location a crater lake could host conditions conducive to the emergence of life, while simultaneously in another unconnected habitat extant life may be flourishing in the sediments at the bottom of an ice-covered body of water (black dots). Extant life is also present in the subsurface. (C) No habitable conditions at the surface of Mars. The frozen cryosphere may still host dormant cells (red dots). In all scenarios there is a continuous rain of extraterrestrial organics.

Westall et al., 2013

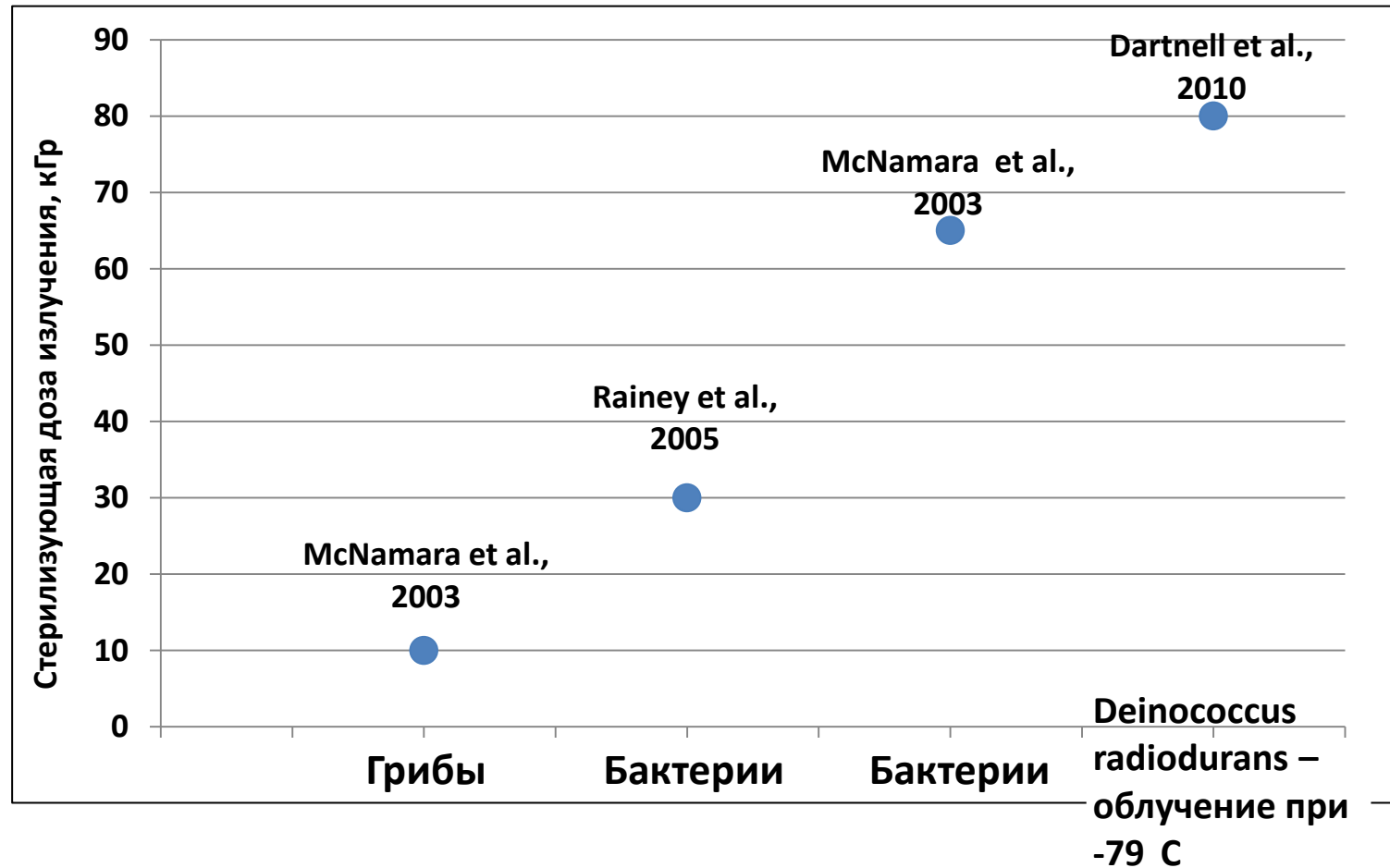
Некоторые микроорганизмы способны выдерживать:

- ❖ давление ~0 - 1100 бар**
- ❖ высокую засоленность**
- ❖ метаболизируют в широком температурном диапазоне (-20 С - +122 С)**
- ❖ живут при рН=0.5 или рН=11**
- ❖ способны к хемолитоавтотрофии**
- ❖ хроническое воздействие гамма-излучения до 60 Гр/ч**
- ❖ воздействие гамма-излучения в дозах до 30 кГр**

На современном Марсе сформировался экстремальный для организмов земного типа комплекс условий. Однако в ходе долговременной эволюции на планете были периоды с более благоприятной для жизни обстановкой.

Если в этот период на Марсе сформировалась жизнь, то есть вероятность, что она сохраняется до сих пор в анабиотическом состоянии, подобно земным сообществам Арктики и Антарктики. При этом **ключевым фактором, обуславливающим гибель клеток и деградацию биомолекул, будет являться ионизирующее излучение.**

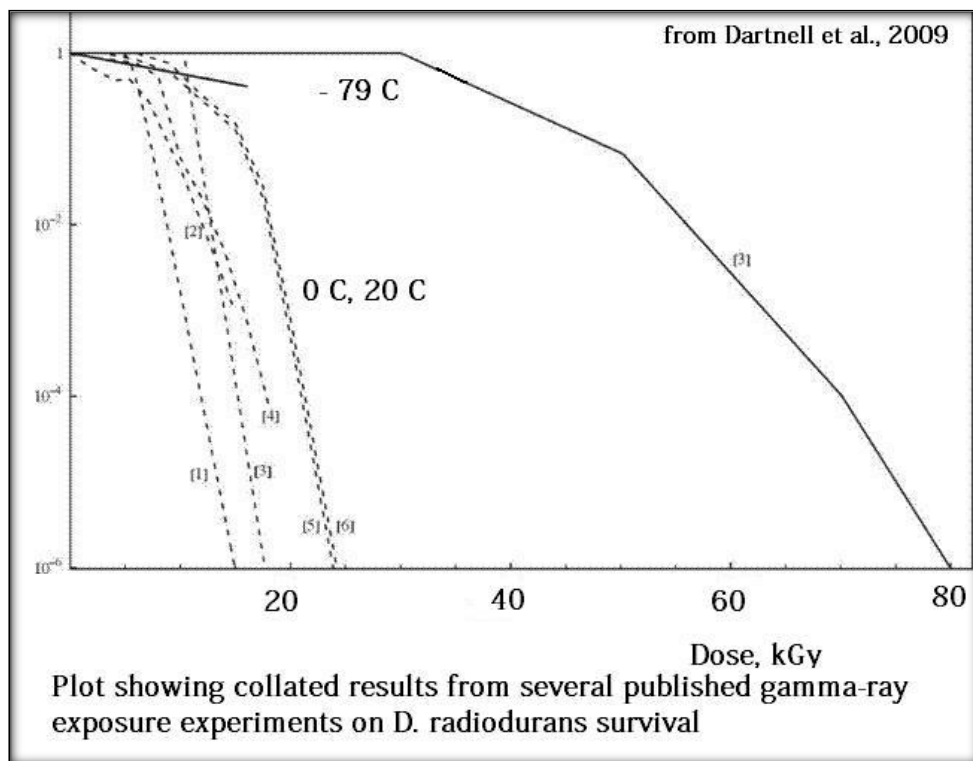
Пределы устойчивости микроорганизмов к воздействию гамма-излучения



Сведения об устойчивости каких-либо микроорганизмов к воздействию радиации в дозах свыше 80 кГр отсутствуют.

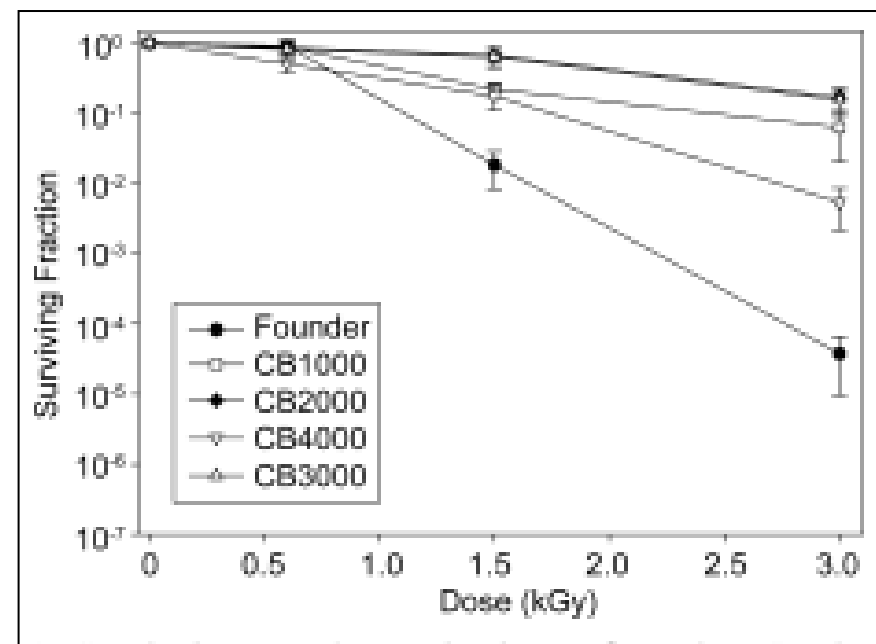
Для прогнозирования устойчивости потенциальной биосферы необходимо изучение естественных сбалансированных микробных систем, а не единичных микроорганизмов, с оценкой их способности сохранения биоразнообразия и биосферных функций (т.е. способности проводить биогеохимические реакции).

При этом в качестве модельных объектов могут быть использованы микробные сообщества экстремальных местообитаний – земных аналогов астробиологических объектов поиска.



Выживание *D. radiodurans* при
разных температурах облучения (по
данным разных авторов)

Dartnell et al., 2010



Предварительное облучение
повышает устойчивость
популяции

Harris et al., 2009

Объекты исследования

- Серозем из пустыни Негев (Израиль) (SN, рис.1) и горная серо-коричневая почва (Марокко) (S1, рис. 2).
- Древние мерзлые осадочные породы Арктики (М-1/91, рис.3) и Антарктики (А-6/99-6, рис. 4)
- Культуры *Kocuria rosea*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Cellulomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, выделенные из серозема из пустыни Негев (Израиль), *Sphingomonas sp.* и *Acinetobacter lwoffii*, *Arthrobacter sp.*, выделенные из антарктического грунтового льда, *Micrococcus roseus* и *Bacillus sp.*, выделенные из образца арктического вечномёрзлого грунта

1



2



3

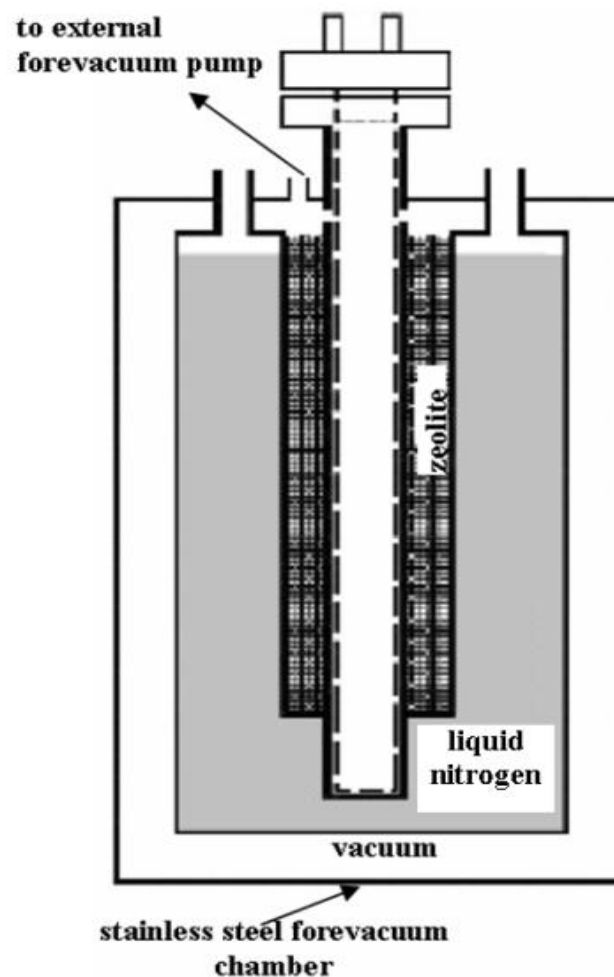


4

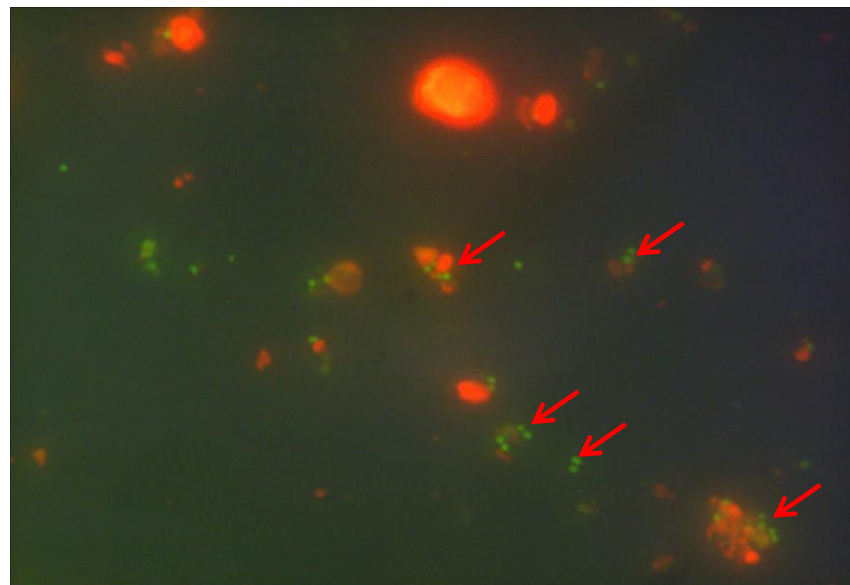
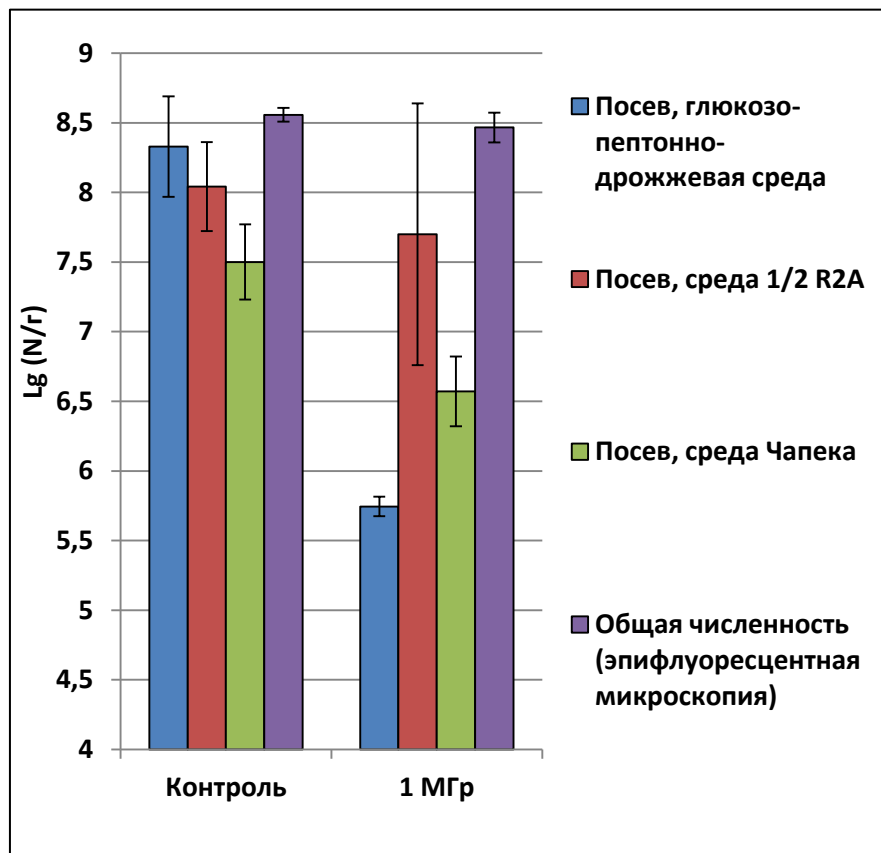


Моделирование условий Марса

Для моделирования условий Марса была сконструирована климатическая камера, позволяющая проводить облучение образцов гамма-излучением (^{60}Co) при интенсивности поглощенной дозы до 16 кГр/ч при стабильно низкой температуре -50°C и давлении 1 торр.



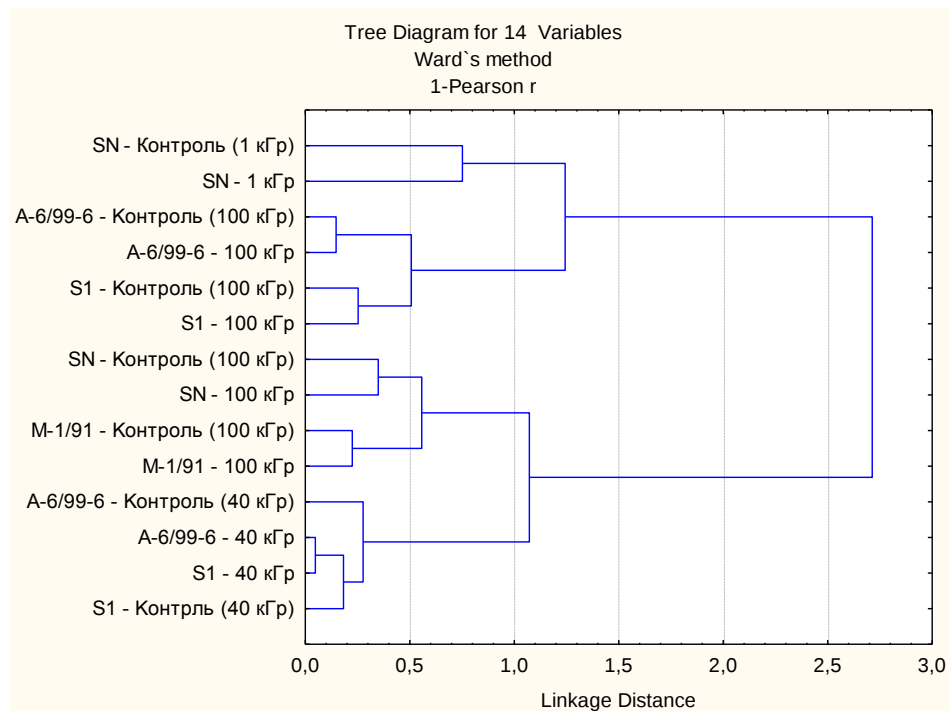
Влияние гамма-излучения (1 МГр), температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность прокариот в образце вечномерзлой породы



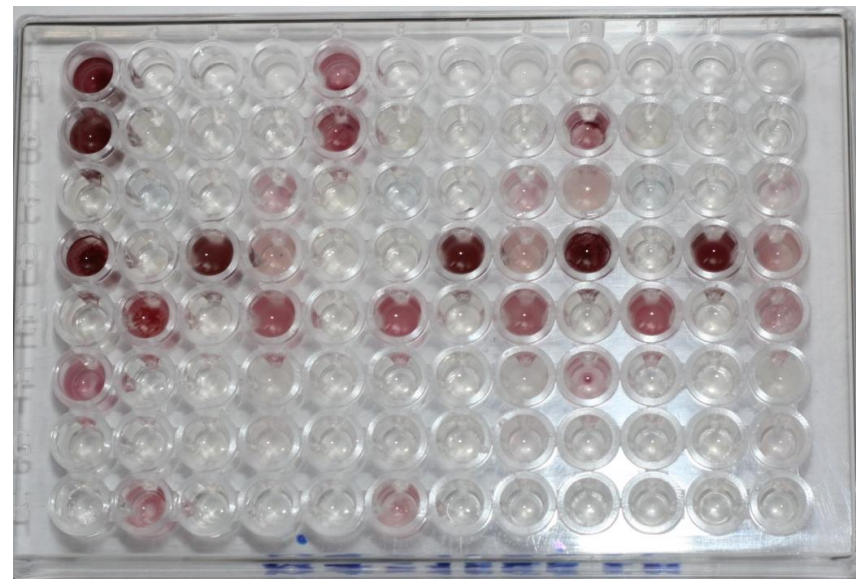
Эпифлуоресцентная микроскопия образца, облученного дозой 1 МГр. Клетки с интактной ДНК флуоресцируют зеленым светом.

Совокупное воздействие высоких доз гамма-излучения (вплоть до 1 МГр), низкой температуры и низкого давления **не приводит к гибели прокариотных комплексов почв и осадочных пород**, но может вызывать изменение их репродуктивной и метаболической активности

Воздействие совокупности стрессовых факторов (облучение 1 Гр-1 МГр, давление 1 торр, температура - 50°C) на функциональное состояние микробных сообществ аридных почв и вечномерзлых грунтов



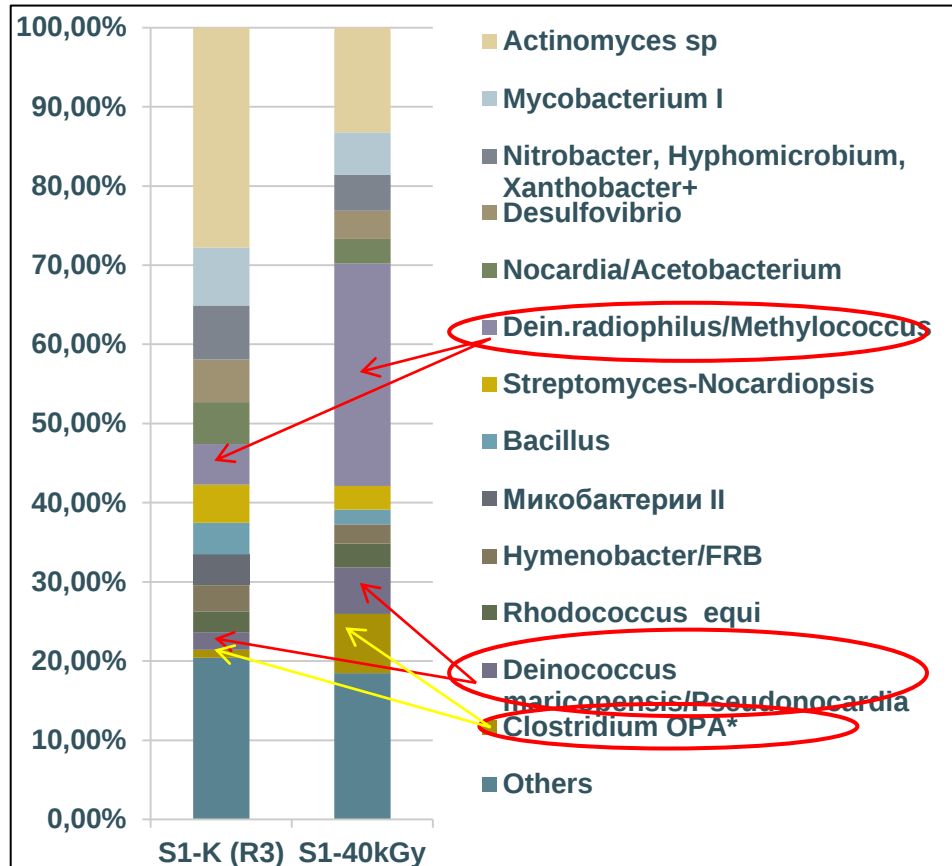
Кластерный анализ спектров потребления субстратов сообществами контрольных и облученных почв и вечномерзлых пород.



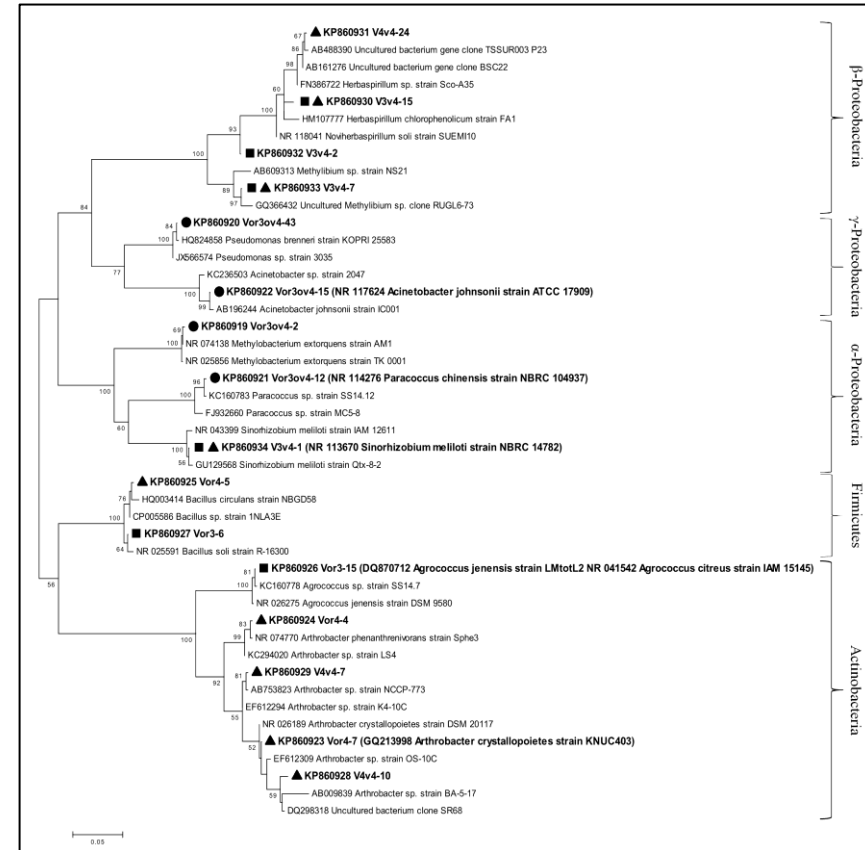
Окраска в лунках планшета появляется при восстановлении индикатора (трифенилтетразолий бромид) при потреблении питательных субстратов микроорганизмами.

Природные микробные системы сохраняли свою способность к выполнению биосферных функций и способность к полному восстановлению.

Воздействие совокупности стрессовых факторов на структуру бактериальных сообществ экстремальных местообитаний



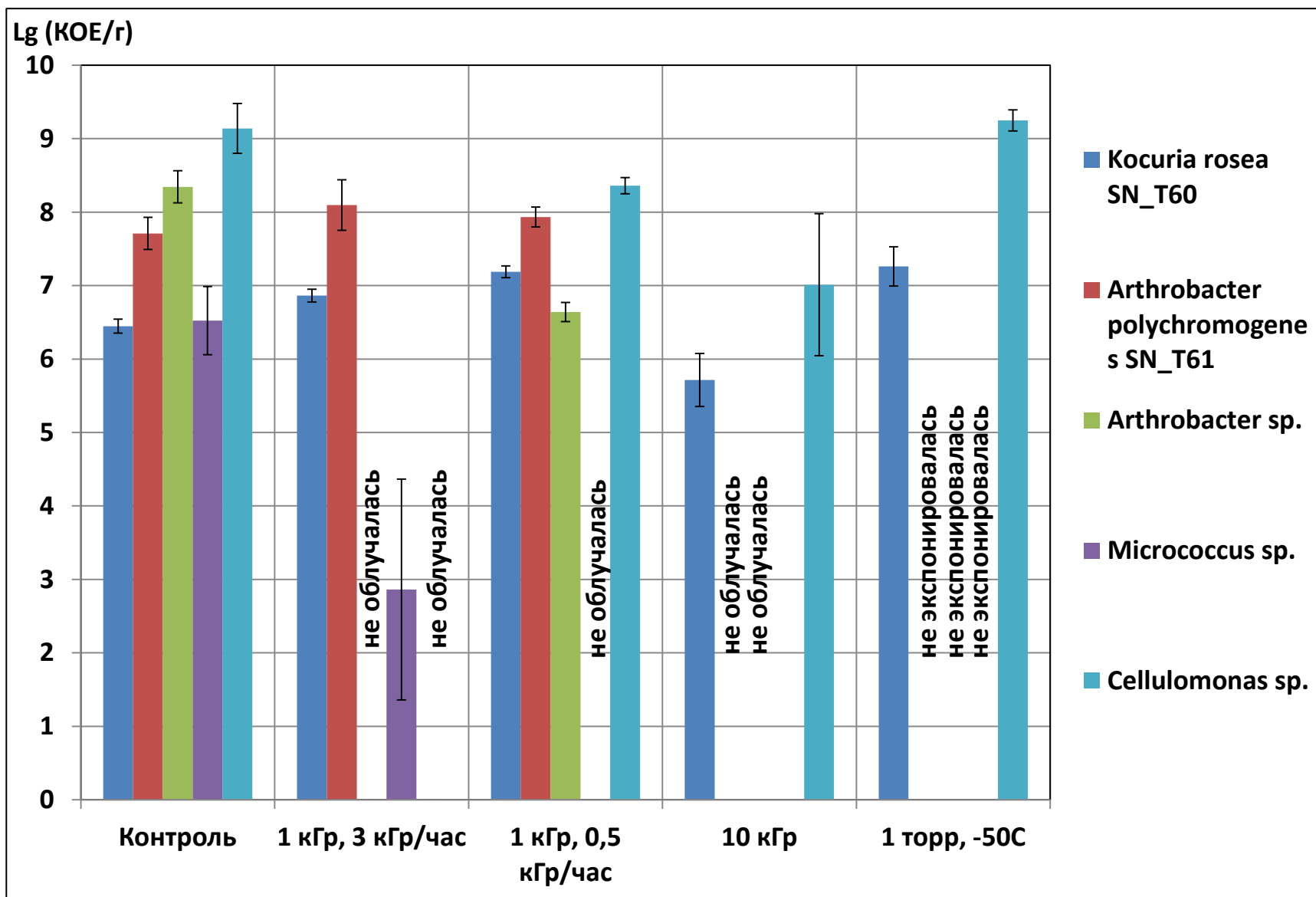
Структура микробного сообщества образца почвы горной пустыни до и после облучения дозой 40 кГр (ГХМС липидных маркеров).



Клонирование. Треугольниками обозначены филоциты образца вечномерзлой породы, облученной дозой 100 кГр.

Структура сообществ и их биоразнообразие сохранились после облучения. Наибольшую устойчивость проявили бактерии родов *Deinococcus*, *Clostridium*, *Methylococcus* и *Arthrobacter*.

Влияние гамма-излучения (1-10 кГр), температуры (-50°C) и низкого давления (1 торр) на численность бактерий (чистые культуры), иммобилизованных в монтмориллоните



Возможные причины высокой устойчивости микробных сообществ к воздействию радиации в модельных условиях

- Низкая температура
- Низкое давление
- Адаптированность к экстремальным условиям
- Протекторная роль органо-минерального комплекса природной среды
- Внутри- и межпопуляционные взаимодействия

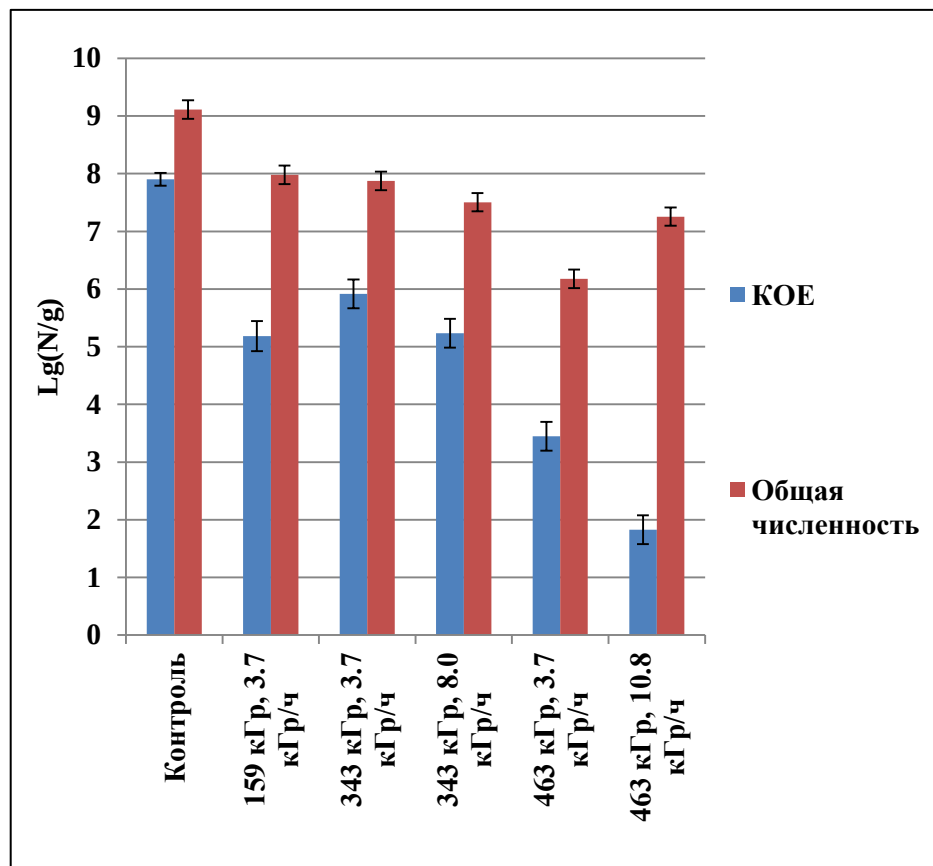
Облучение почв и вечномерзлых пород гамма-излучением в условиях, близких к нормальным

Проведено облучение гамма излучением в градиенте доз 159 кГр, 350 кГр, 450 кГр, 750 кГр, 1 МГр, 1.35 МГр образцов серозема из пустыни Негев, арктической вечномерзлой породы и дерново-подзолистой почвы при давлении 1 атм. и температуре около +16 С.



Гамма-установка
«Исследователь»

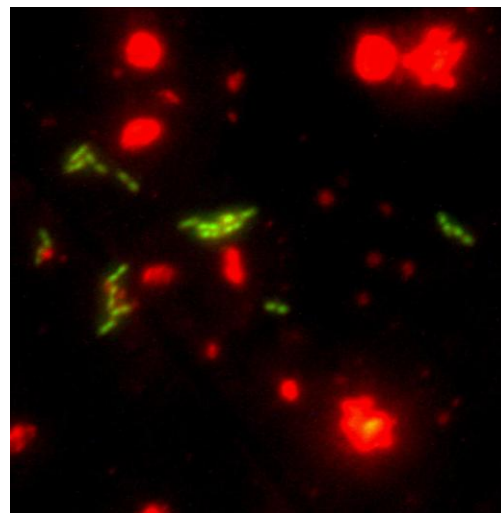
Облучение почв и вечномерзлых пород гамма-излучением в условиях, близких к нормальным



Влияние гамма-излучения на число
культивируемых бактерий и общую
численность прокариот в образцах серозема



Бактерии,
культивируемые
из облученного
образца серозема



Эпифлуоресцент-
ная микроскопия
облученного
образца серозема.
Клетки с
интактной ДНК
имеют зеленую
флуоресценцию.

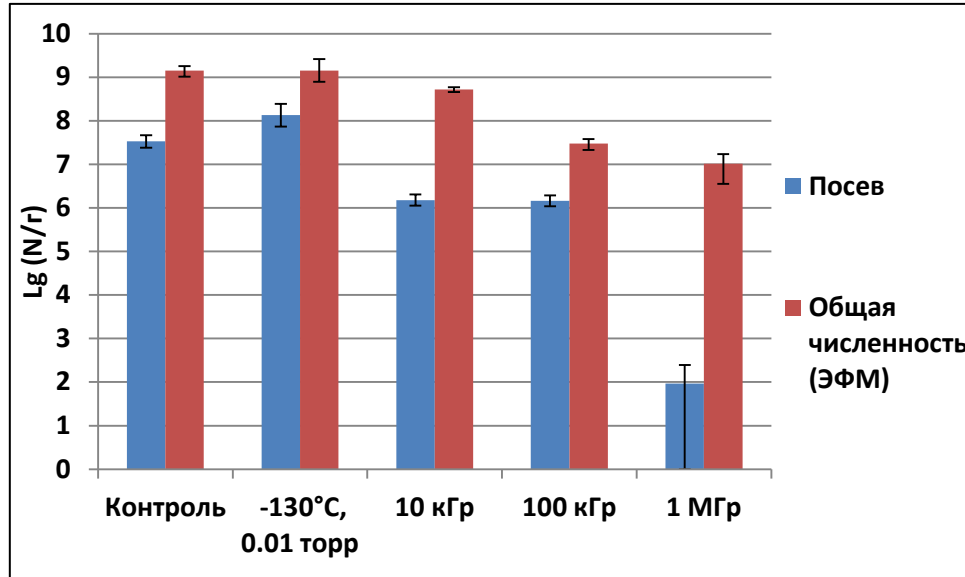
Моделирование воздействия ускоренных электронов (1МэВ), низкой температуры (-130°С) и низкого давления (0,01 торр)



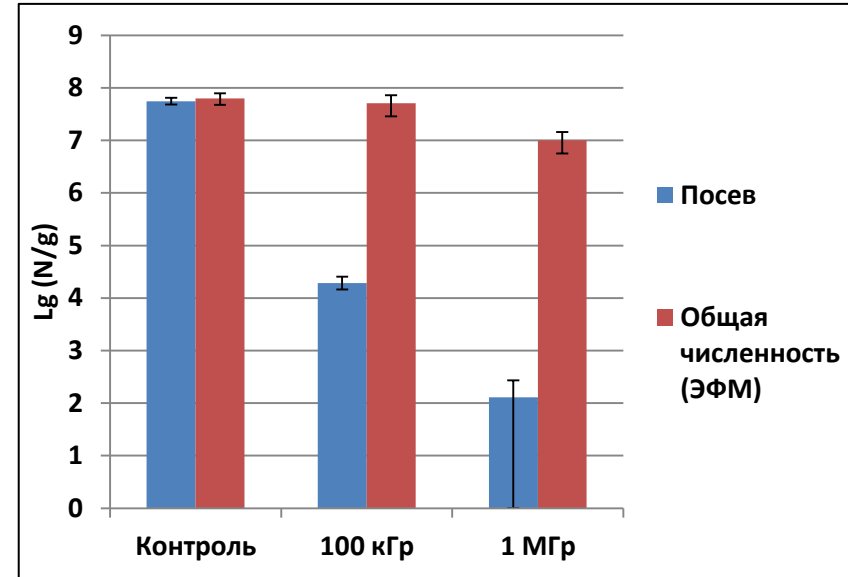
Была разработана новая климатическая камера, позволяющая проводить облучение образцов электронами (1 МэВ) при интенсивности поглощенной дозы около 2,8 кГр/с при стабильно низкой температуре - 130°С и давлении около 0,01 торр.

Проведено облучение почв, вечномёрзлых пород и чистых культур бактерий в дозах 10 кГр, 100 кГр, 1 МГр, 5 МГр, 10 МГр.

Влияние электронов (1 МэВ), температуры (-130°C) и низкого давления (0,01 торр) на численность прокариот в образцах вечномерзлой породы и пустынной почвы



Пустынная почва

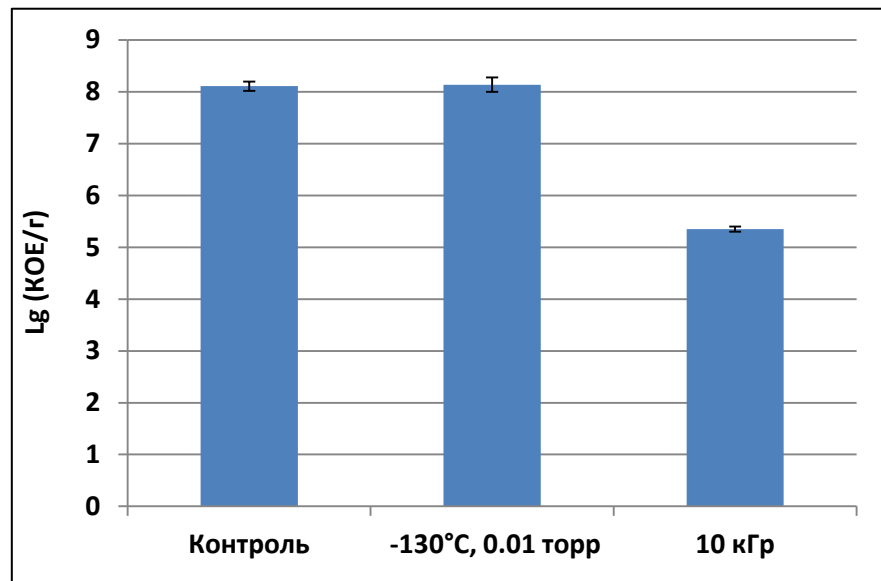


Вечномерзлая порода

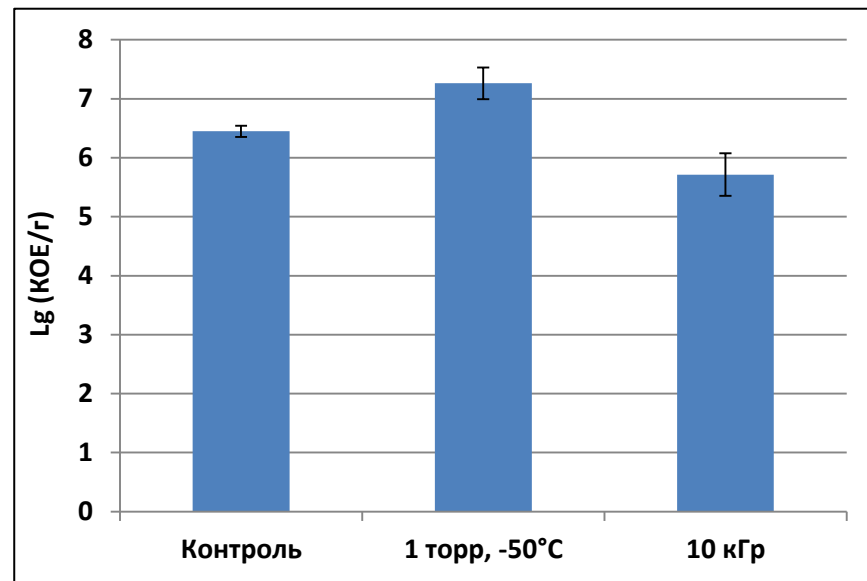
Совокупное воздействие ряда экстремальных факторов значительно сократило численность прокариот в исследованных образцах, а также привело к резкому снижению потенциальной метаболической активности микробных сообществ и разнообразия культивируемых бактерий.

Облучение электронами в сравнении с воздействием гамма-излучения вызывало значительно большие повреждения микробных сообществ. Воздействие дозы 10 кГр привело к резкому снижению метаболической активности и сокращению численности и разнообразия культивируемых бактерий. В то же время, репродуцирующие жизнеспособные клетки обнаруживались и после облучения электронами дозой 1 МГр.

Влияние ионизирующей радиации, низких температур и низкого давления на численность чистых культуры бактерии *Kocuria rosea*, иммобилизованной в монтмориллоните



Электроны (1 МэВ), -130 С, 0.01 торр



Гамма-излучение, -50 С, 1 торр

Полученные данные позволяют предполагать возможность сохранения потенциальных внеземных микробных сообществ в анабиотическом состоянии:

а) в течение не менее 13-20 млн. лет в поверхностном слое марсианского реголита в условиях, близких к современным;

б) в течение 200-500 тыс. лет в открытом космосе (в составе метеоритов);

в) в течение 1100-1300 лет в поверхностном слое льда Европы.

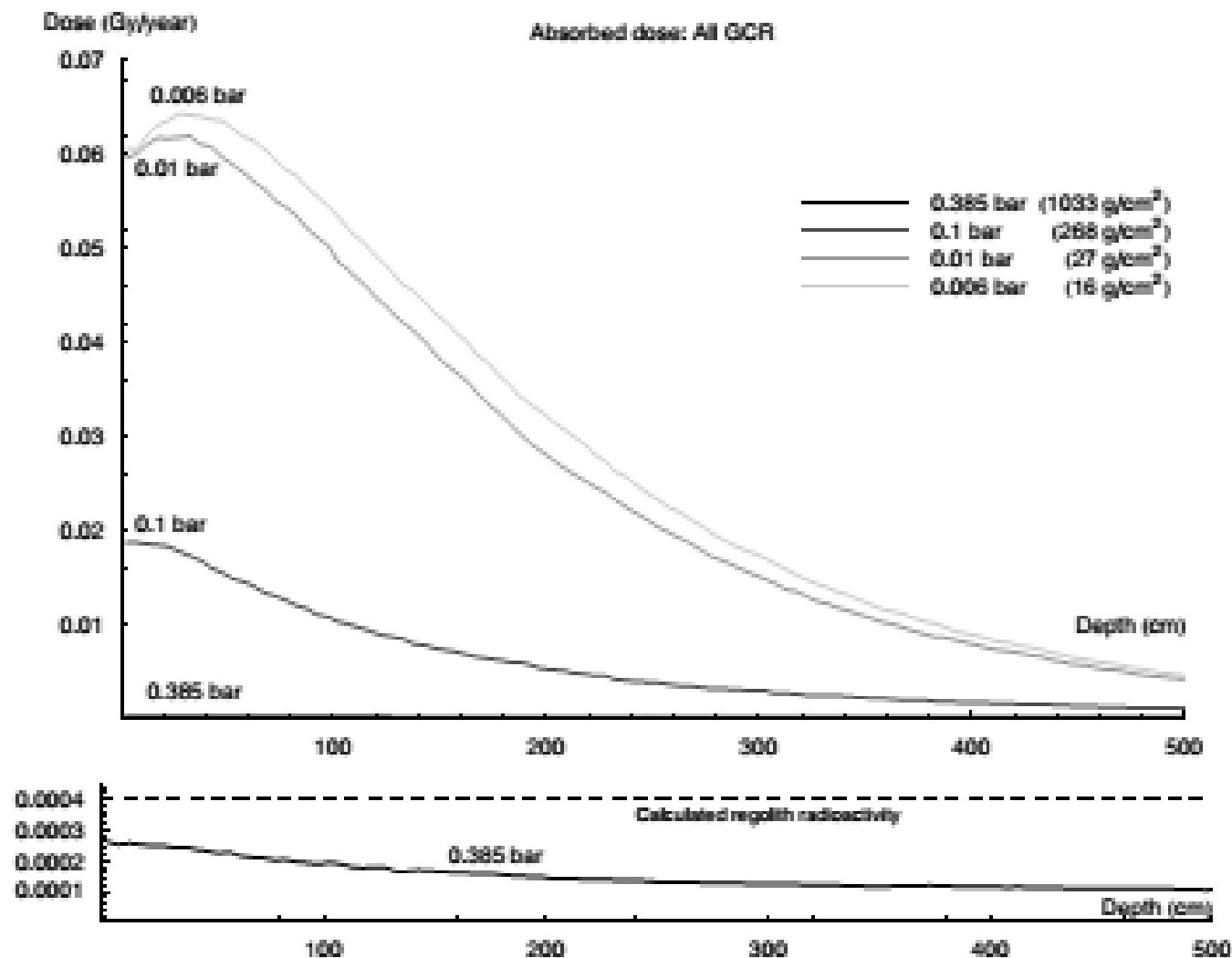
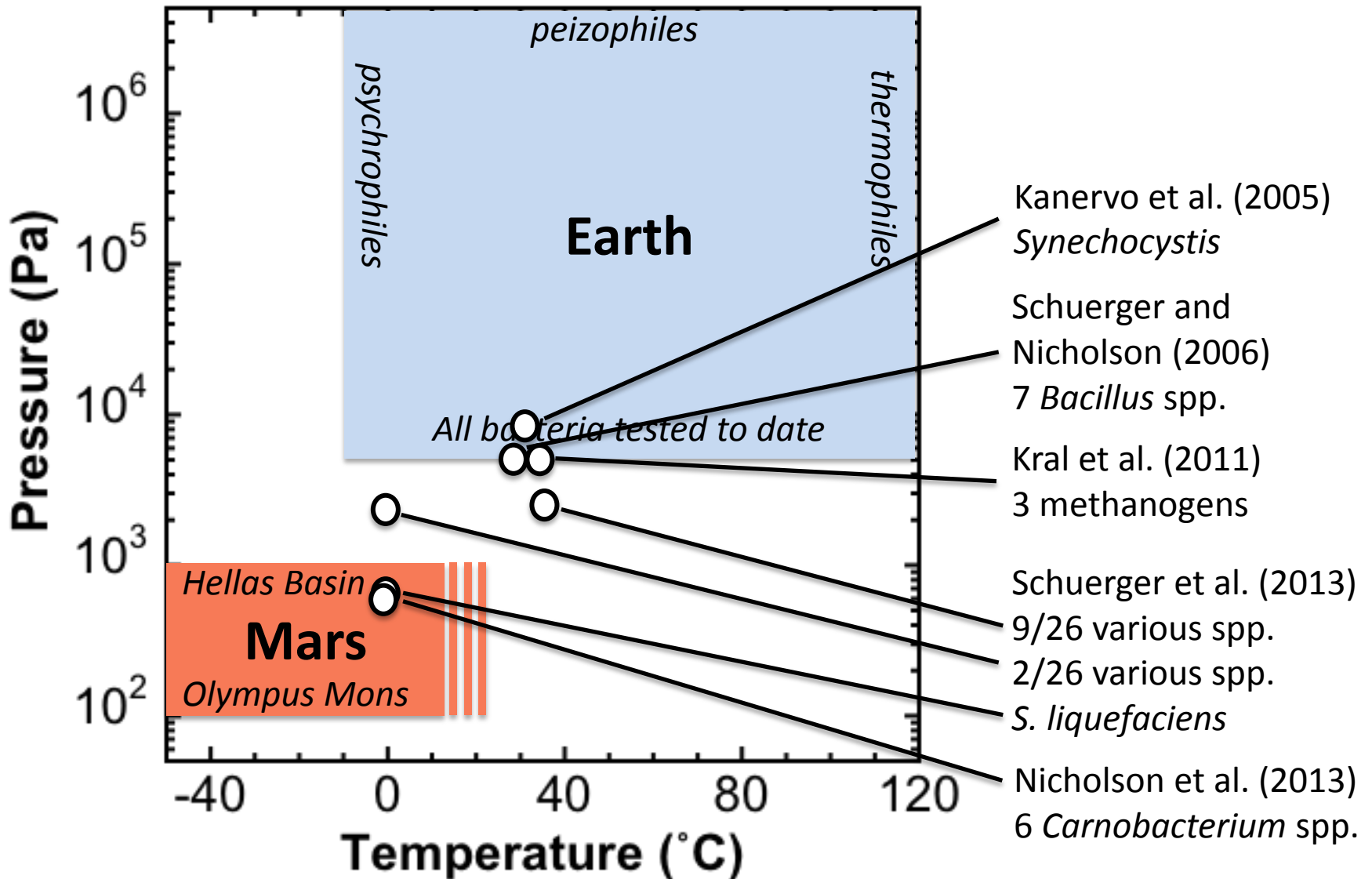


Fig. 10. Subsurface dose profiles under decreasing atmospheric depths, over the geological history of Mars. Rescaled plot of 0.385 bar case shown below.

TABLE 2. LOW-TEMPERATURE METABOLISM OF MICROORGANISMS

<i>T</i> (°C)	Activity	Method	Environment	Time (days)	Reference
<i>Brines</i>					
-12	Cell division DT 10 days	Turbidity measurement	Culture of sea ice isolate <i>Psychromonas ingrahamii</i> in 5% glycerol	42	Breezee <i>et al.</i> , 2004
-13.5	Protein synthesis	Uptake of ³ H-leucine	Lake Vida samples (188 psu salinity, primarily Cl ⁻ , Na ⁺ , Mg ²⁺)	6–30	Murray <i>et al.</i> , 2012
-15	Cell division DT 50 days	Plate counts	Culture of permafrost isolate <i>Planococcus halocryophilus</i> Orl in 18% NaCl, 7% glycerol	200?	Mykytczuk <i>et al.</i> , 2013
<i>Ices and frozen environments</i>					
-5	Respiration (maybe cell division, DT 43 days)	CTC reduction, cell numbers, respiration of ¹⁴ C-acetate, incorporation of ³ H-adenine, ³ H-leucine	Frozen cultures of glacial ice isolate <i>Paenisporoarcina</i> sp. and <i>Chryseobacterium</i>	50	Bakermans and Skidmore, 2011a
-10	CH ₄ production	Reduction of H ¹⁴ CO ₃ ⁻	Arctic permafrost	21	Rivkina <i>et al.</i> , 2007
-18	Metabolism	Incorporation of ¹⁴ CO ₂	Frozen cultures of permafrost isolates	90	Panikov and Sizova, 2007
-18	Cell division DT 34 days	Plate counts	<i>Rhodotorula glutinis</i> (yeast) inoculated onto surface of frozen peas	200	Collins and Buick, 1989
-20	Metabolism	Incorporation of ¹⁴ C-acetate into lipids	Permafrost microcosms	550	Rivkina <i>et al.</i> , 2000
-20	Protein synthesis	Uptake of ³ H-leucine	Frozen culture of sea ice isolate <i>Colwellia psychroerythraea</i> 34H	6	Junge <i>et al.</i> , 2006
-20	DNA replication	Incorporation of ¹³ C-acetate into DNA	Microcosms of permafrost from Alaska, many bacterial species active	180	Tuorto <i>et al.</i> , 2014
-15, -33	Respiration	CTC reduction, respiration of ¹⁴ C-acetate	Frozen cultures of glacial ice isolates <i>Paenisporoarcina</i> sp. and <i>Chryseobacterium</i>	200	Bakermans and Skidmore, 2011b
-25	Respiration	Mineralization of ¹⁴ C-acetate to ¹⁴ CO ₂	Permafrost microcosms with <i>Planococcus halocryophilus</i> Orl added	200	Mykytczuk <i>et al.</i> , 2013
-32	Ammonia oxidation	¹⁵ N ₂ O production from ¹⁵ N-ammonia	Frozen culture of marine isolate <i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	307	Miteva <i>et al.</i> , 2007
-15 to -40	Photosynthesis?	Fluorescence of chlorophyll <i>a</i> in photosystem II	Thalli of lichen <i>Pleopsidium chlorophanum</i> collected from Antarctica and incubated in Mars simulation chamber	35	de Vera <i>et al.</i> , 2014

Summary of published hypobaric experiments to date



Одним из основных факторов, лимитирующих метаболизм, рост и размножение организмов земного типа в условиях современного Марса является дефицит жидкой воды.

Возможные источники доступной для микроорганизмов воды:

- **Криопэги**
- **Временные водные потоки**
- **Гигроскопичные соли**
- **Сублимация льда через реголит**

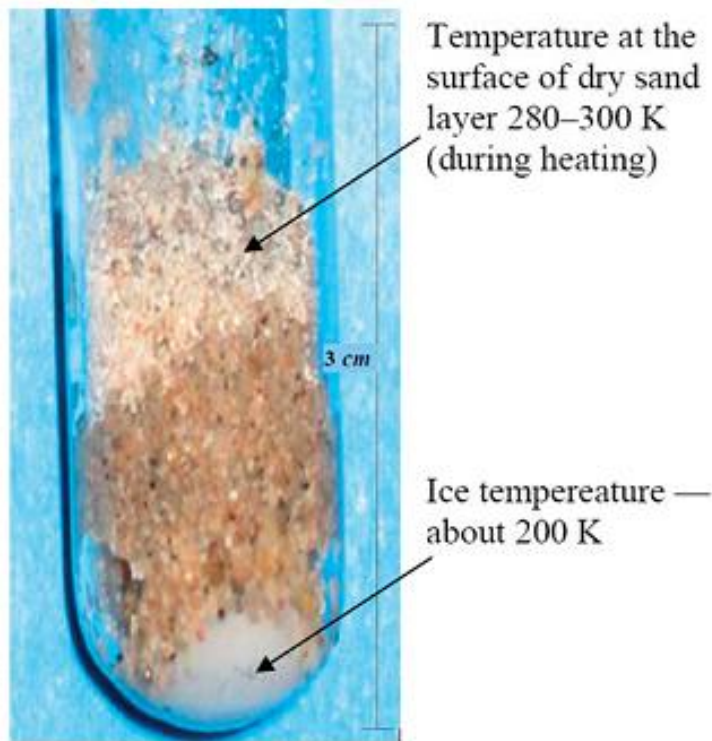


Fig. 4. Sample structure after experimental run: ice remnant on the bottom, thin dry layer of sand on the top and 'wet layer' (darker sand) in the middle with mean water content up to $\sim 30\%$. The 'wet' sand layer is actually solid – part of the water is in the form of ice, but some amount of liquid water films has to be present.

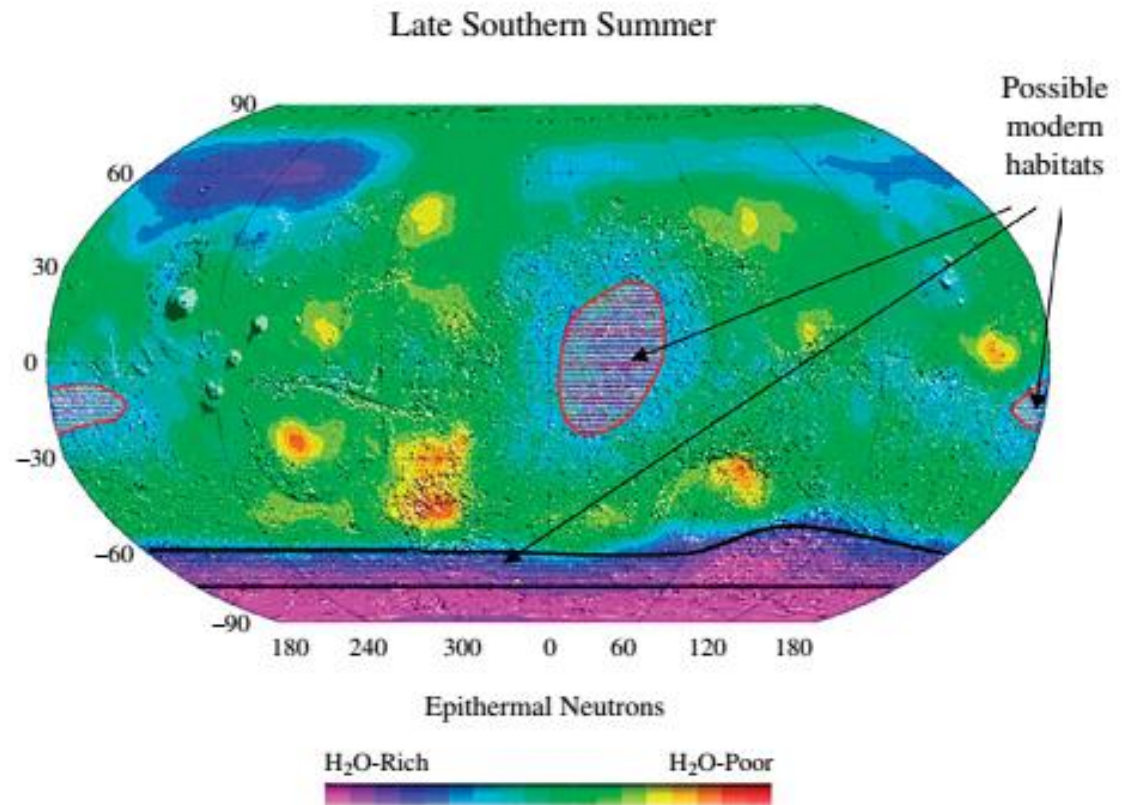
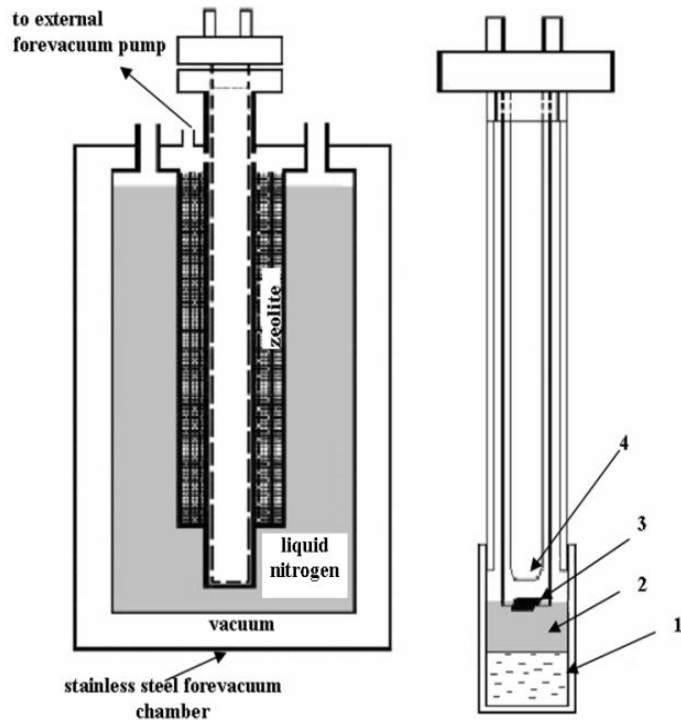


Fig. 5. Locations of the hypothetical habitats on Mars.

Моделирование температурных циклов Марса и сублимации подповерхностного льда через реголит



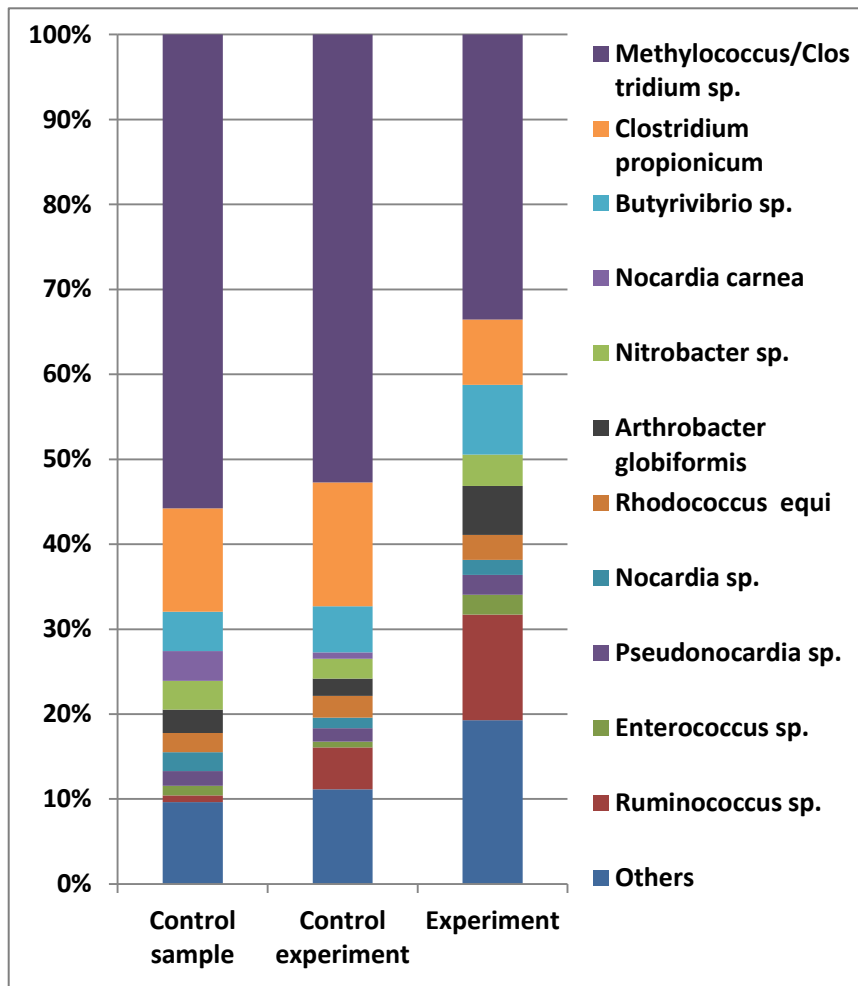
Вакуумная камера для облучения опытных образцов и моделирования процесса сублимации льда: 1 – лед (при необходимости); 2 – образец; 3 – термодатчик температуры; 4 – нагреватель.

Экспериментальный цикл занимал трое суток (около 72 часов), в течение которых трижды проводили:

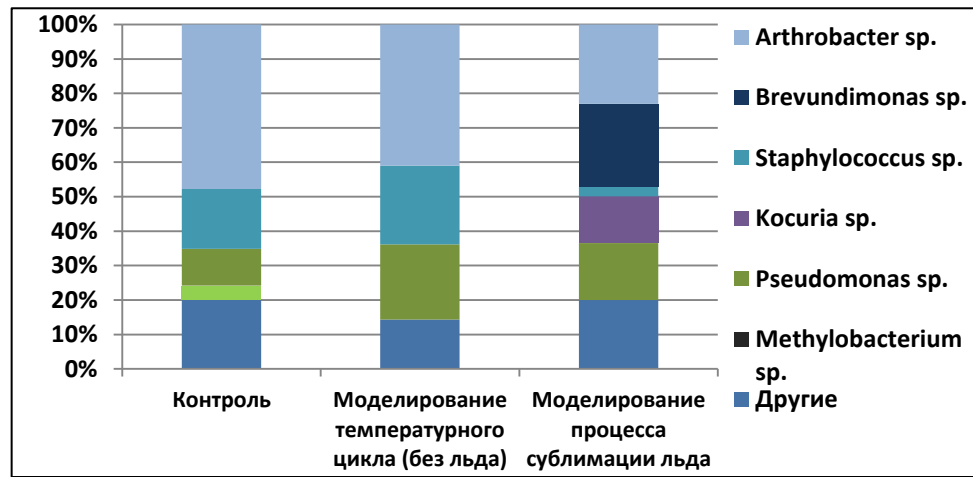
- прогрев поверхности песка до постоянной температуры 280–300 К длительностью 4–5 часов;
- охлаждение образца жидким азотом до 200 К — 19–20 часов.

В ходе эксперимента произошло увеличение влажности образца с 1,2% до 7,2%.

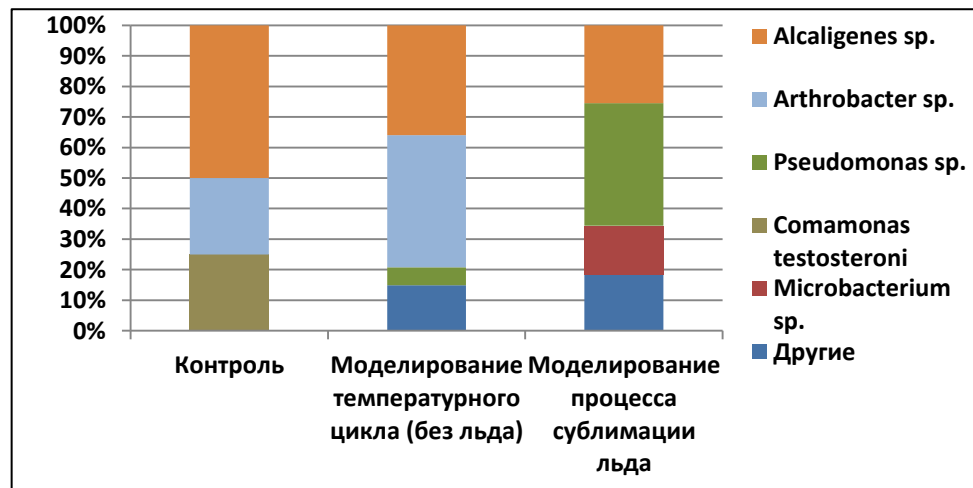
Моделирование температурных циклов поверхности Марса и сублимации подповерхностного льда через реголит



Структура микробного сообщества образца вечномёрзлой породы *in situ* при моделировании температурного цикла поверхности Марса и сублимации подповерхностного льда (ГХМС липидных маркеров).



Структура культивируемого блока микробного сообщества образца вечномёрзлой породы при моделировании температурного цикла поверхности Марса и сублимации подповерхностного льда (на среде ГПД – сверху, на среде ½ R2A – снизу; MALDI-TOF MS).



Заключение

Природные микробные сообщества Земли и чистые культуры бактерий, выделенные из экстремальных местообитаний (аридные почвы и вечномёрзлые осадки) способны выдерживать воздействие моделируемых условий марсианского реголита и открытого космоса.

Микробные сообщества *in situ* сохраняют жизнеспособность при облучении ионизирующей радиацией в дозах, соответствующих облучению в верхних слоях марсианского реголита в течение не менее 13 млн. лет в условиях низкого давления, низких температур и в присутствии сильных окислителей.

Спасибо за внимание!