

## МИКРОБИОЛОГИЯ КРИОСФЕРЫ

УДК 551.345; 573.5

DOI: 10.21782/KZ1560-7496-2019-6(27-36)

МИКРООРГАНИЗМЫ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ В КОСМИЧЕСКОМ ПРОСТРАНСТВЕ:  
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА “ЭКЗОБИОФРОСТ”

Е.М. Ривкина, Е.В. Спирина, А.В. Шатилович, Л.А. Шмакова, А.А. Абрамов

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,  
142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 2, Россия; elizaveta.rivkina@gmail.com*

Результаты эксперимента “Экзобиофrost” на биоспутнике БИОН-М1 показали, что воздействие факторов космического полета (ионизирующее излучение, перегрузки и температурные перепады) не привели к полной стерилизации образцов многолетнемерзлых пород. Значительная часть бактериально-го сообщества сохранила жизнеспособность после полетного эксперимента. Послеполетный анализ и сравнение с контрольными образцами показали, что современные тундровые кольподы более устойчивы к воздействию условий космоса, чем ископаемые представители, а штаммы *Colpoda steinii* более устойчивы, чем инфузории вида *Exocolpoda augustini*. Наибольшую устойчивость в эксперименте продемонстрировали цисты акантамеб (*Acanthamoeba* sp.), и их можно рассматривать в качестве модельных организмов для дальнейших экспериментов как в космическом пространстве, так и на Земле.

*Многолетнемерзлые породы, микроорганизмы, космическое пространство*PERMAFROST MICROORGANISMS IN THE OUTER SPACE:  
RESULTS OF THE “EXOBIOFROST” EXPERIMENT

E.M. Rivkina, E.V. Spirina, A.V. Shatilovich, L.A. Shmakova, A.A. Abramov

*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS,  
2, Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia; elizaveta.rivkina@gmail.com*

The results of the “Exobiofrost” experiment aboard the BION-M1 biosatellite showed that the impact of space flight factors (ionizing radiation, g-force, and temperature fluctuations) did not lead to complete sterilization of the permafrost samples. According to the Post-flight analysis, a significant part of the bacterial community has remained viable after the space experiment. A comparison with control samples showed that modern tundra colpodas are more resistant to the effects of space conditions, than representatives of ancient permafrost, and that *Colpoda steinii* strains are more resistant than ciliates of the *Exocolpoda augustini* species. The greatest resistance to space flight conditions demonstrated by acanthamoeba cysts (*Acanthamoeba* sp.) allows to view them as model organisms for both the Earth and space experiments in future.

*Permafrost, microorganisms, outer space*

## ВВЕДЕНИЕ

Существование в криосфере Земли жизнеспособных организмов можно использовать как концептуальную модель экстремально холодной среды обитания и мерзлотных условий других планет. Междисциплинарный синтез геологических и биологических знаний позволяет расширить представления человечества о пространственных и временных границах биосферы и о возможности присутствия жизни за пределами Земли [Rivkina et al., 2018].

Ранее было показано, что микроорганизмы, законсервированные в вечной мерзлоте в течение длительного времени (от нескольких тысяч до миллиона лет) сохраняют жизнеспособность [Rivkina et al., 2018]. Все это время они находятся в ус-

ловиях отрицательных температур, отсутствия свободной воды и испытывают воздействие естественной радиации, источником которой являются минералы вмещающих пород. Сам факт сохранения жизнеспособности делает эти микроорганизмы уникальным объектом для модельных астробиологических исследований. Состав микробного сообщества, выжившего в условиях вечной мерзлоты, – результат непрерывной селекции при сочетании отрицательных температур, отсутствия свободной воды и дефицита питательных веществ [Friedmann, 1994; Morita, 2000]. Из многолетнемерзлых отложений и современных почв Арктики и Антарктиды за последние 20 лет были выделены аэробные и анаэробные бактерии, мета-

ногенные археи, цианобактерии и зеленые водоросли, дрожжи и мицелиальные грибы, гетеротрофные протисты [Gilichinsky, Rivkina, 2011], многие из которых представлены новыми видами [Rivkina et al., 2018]. Селектирующая роль криогенеза в формировании адаптированных к отрицательным температурам микробных сообществ в многолетнемерзлых породах проявляется через стресс замораживания–оттаивания еще на стадии промерзания отложений [Губин и др., 2016; Spirina, Fyodorov-Davydov, 1998].

Установлено, что микроорганизмы тундровых почв и многолетнемерзлых пород более устойчивы к низким температурам и повторяющимся процессам заморзания–оттаивания, чем микроорганизмы из никогда не замерзавших отложений [Гиличинский и др., 1991]. Эксперименты показали, что после большого числа фазовых переходов микробные сообщества из многолетнемерзлых отложений не менялись ни качественно, ни количественно. Это говорит о сохранении микробиоценоза физиологических особенностей, приобретенных ими при многократном заморзании–оттаивании в период формирования, в то время как в опытах с никогда не замерзавшими почвами после 5–12 циклов пробы становились почти стерильными. Одним из возможных механизмов, обеспечивающих стабильность клеточных структур при заморзании–оттаивании микроорганизмов из многолетнемерзлых отложений, является накопление в клетках осмопротекторов [Soina, Vorobyova, 2004]. Другой важный фактор, влияющий на сохранность микроорганизмов, – устойчивость к воздействию радиации. Известно, что предельная доза ионизирующей радиации для клеток при положительных температурах составляет  $3 \cdot 10^4$  Гр [Battista, 1997]. За миллион лет непрерывного пребывания в условиях мерзлоты суммарная доза радиации, полученная клетками, составляет  $0.6 \cdot 10^4$  Гр, что заведомо недостаточно для полной стерилизации толщи. В экспериментах по оценке влияния радиации на биоту образцы многолетнемерзлых отложений с известной численностью жизнеспособных клеток подвергали облучению от  $10^4$  до  $10^5$  Гр, после чего в них вновь определяли количество жизнеспособных организмов [Cheptsov et al., 2018; Vorobyova et al., 2018]. Доза радиации, достаточная для стерилизации талого образца, при воздействии на мерзлый оставляла большую часть микробного сообщества в жизнеспособном состоянии. Микроорганизмы из образцов многолетнемерзлых отложений росли даже после дозы облучения в  $10^5$  Гр. Таким образом, в осадочном чехле Арктики и Антарктиды излучение, источником которого являются минералы, не летально для микроорганизмов, а сама мерзлота играет протекторную роль, уве-

личивая устойчивость микробиоценозов к облучению.

В научной литературе представлены факты, обосновывающие возможность сохранения следов жизни на других планетах Солнечной системы [Демидов и др., 2012; Gilichinsky et al., 2007, 2011, 2015; Rivkina et al., 2018] и переноса живой материи в космическом пространстве (панспермия) [Crick, Orgel, 1973; Wickramasinghe et al., 2018]. Одним из основных механизмов переноса биоты считается транспортировка и сохранение жизнеспособных организмов в составе комет и метеоритов. Предполагается, что метеоритный материал способен обеспечить защиту от космического излучения и предохранить микробные клетки от разрушения. Многими исследователями [Rettberg et al., 2002; и др.] было показано, что слой искусственного метеоритного материала толщиной в несколько микрон способен защитить споры бацилл от ультрафиолетового (УФ) излучения. Метеоритный материал массой  $0.5 \text{ г/см}^2$  может защитить от рассеянного рентгеновского излучения, а массой  $30 \text{ г/см}^2$  – от частиц солнечного ветра. В многолетнемерзлых породах Земли, помимо жизнеспособных микроорганизмов, сохраняются следы их жизнедеятельности – от потенциально активных ферментов и пигментов до биогенных газов и аутигенных минералов. В работах [Rivkina et al., 2000, 2007] показано, что в мерзлоте возможны метаболические реакции при температурах до  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , способствующие сохранению жизнеспособности микробных клеток в течение длительного периода, от нескольких тысяч до миллиона лет. Поэтому сам факт существования в криосфере Земли жизнеспособных организмов и продуктов их метаболизма можно использовать для концептуальной модели, адаптированной к космическим объектам криогенного типа [Cameron, Morelli, 1974; Gilichinsky et al., 1993, 1995; Vorobyova et al., 1996; Soina, Vorobyova, 2004].

Как известно, семь из девяти планет Солнечной системы, их спутники, многие кометы и астероиды являются криогенными объектами. Они прошли несколько стадий развития на раннем этапе своей истории, в течение которых могли зародиться примитивные формы жизни. Поскольку обнаружение следов жизни на поверхности космических тел маловероятно из-за отсутствия жидкой воды, высокой радиации и других неблагоприятных факторов, новой стратегией поисков жизни на Марсе стал поиск специфических экосистем в приповерхностном слое многолетнемерзлых отложений. Мерзлые толщи Земли могут рассматриваться в качестве модели экстремально холодной среды обитания других планет. Жизнеспособные микроорганизмы и их метаболиты в мерзлых толщах Земли представляют собой прообраз инопла-

нетных экосистем на ранней стадии развития, другими словами, если жизнь там когда-либо существовала, то следы ее в виде микроорганизмов и их метаболитов лучше всего могли сохраниться внутри многолетнемерзлых толщ.

### ЦЕЛИ, ЗАДАЧИ И СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Целью исследования было изучение влияния открытого космоса на биологические объекты. В рамках проекта “Экзобиофрост” на биоспутнике БИОН-М1 исследовали микробные комплексы многолетнемерзлых пород различного возраста и генезиса Северо-Востока России (Колымская низменность) и Антарктиды (табл. 1), а также чистые культуры микроорганизмов, изолированные из этих отложений. В задачу эксперимента входило сравнение состава выделяемого микробного комплекса до и после полета, т. е. исследование влияния открытого космоса и факторов полета космического аппарата (КА) на сохранность микроорганизмов. Для эксперимента были разработаны специальные контейнеры (рис. 1), произведенные в СКБ КП ИКИ РАН. Контейнеры с образцами крепили на внешней обшивке спутника на плате полезной нагрузки (ППН) непосредственно перед стартом космической ракеты. После выхода на расчетную орбиту внешняя крышка откидывалась, ППН экспонировалась в открытом космосе, а по завершении полета крышка закрывалась, предохраняя ППН от перегрева на спуске. Помимо образцов, помещенных в специальные контейнеры ППН, дубликаты почти всех образцов помещали внутрь спутника, где была постоянная температура 20–22 °С. Для контроля температурного режима во время полета в три контейнера были помещены регистраторы температуры iButton DL1922, погрешность измерения 0.5 °С. Полет продолжался один месяц – с 19 апреля по 19 мая 2013 г. Орбита спутника была близка к круговой, высота орбиты 575 км. Расчетный перепад температур на поверхности спутника

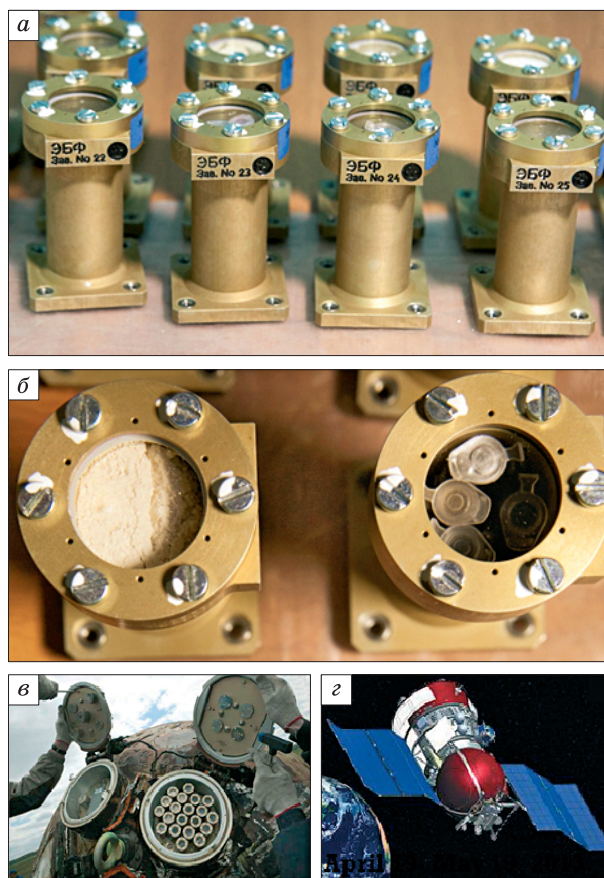


Рис. 1. Контейнеры с образцами в эксперименте “Экзобиофрост”.

а – внешний вид контейнеров; б – вид контейнеров сверху с образцами; в – размещение контейнеров на поверхности на ППН спутника БИОН-М1; г – спутник БИОН-М1 в полете (схема).

+125/–150 °С. Согласно [Olsson-Francis, Cockell, 2010], космическая ионизирующая радиация на высоте полета спутника может варьировать от 33 до 830 Гр в месяц, что на 6–8 порядков больше, чем на Земле.

Таблица 1. Описание образцов многолетнемерзлых отложений

№	Скважина	Глубина, м	Возраст	Описание
1	4/09 (Среднее течение р. Чукочьа, Колымская низменность, Арктика)	8.7–8.8	Поздний плейстоцен (Q <sub>III</sub> )	Высокольдистый суглинок
2	3/09 (Там же)	9.25–9.45	Плейстоцен–поздний плиоцен (Q <sub>I</sub> –N <sub>2</sub> )	Малольдистый опесчаненный суглинок
3	2/08 (Дуваный Яр, р. Колыма, Арктика)	7.0	Голоцен (Q <sub>IV</sub> )	Суглинок
4	3–4/07 (Арктика)	20.6–20.7	Поздний плейстоцен (Q <sub>III</sub> )	Супесь
5	LA56-Pr-04 станция Прогресс, (Антарктида)	0–0.02	Современные	Очес мха с зеленой массой

## ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отобранные для экспериментов в открытом космосе образцы мерзлоты разного возраста и генезиса (см. табл. 1) и цисты простейших были помещены в контейнеры, которые до начала транспортировки к месту старта ракеты и после возвращения в лабораторию хранили при температуре  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Транспортировку на Байконур осуществляли в течение 4 ч в термостатируемых камерах с хладагентами, способными удерживать начальную температуру проб 24 ч. По прибытии на Байконур контейнеры были перемещены в стационарную морозильную камеру и до монтажа ППН на биоспутник находились при температуре  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . К сожалению, температурный режим проб был нарушен, так как монтаж ППН осуществляли при температуре  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ , при этой же температуре контейнеры с пробами оставались в течение 3 дней до старта космического корабля.

Ранее из многолетнемерзлых отложений Арктики были выделены жизнеспособные штаммы протистов типа *Amoebozoa* и *Ciliata*, принадлежащие к разным родам: *Acanthamoeba*, *Flamella*, *Acramoeba*, *Vannella*, *Phalansterium*, *Cohliopodium* [Шмакова, Ривкина, 2015] и *Colpoda* [Shatilovich et al., 2015]. В качестве одного из объектов для участия в эксперименте были отобраны штаммы инфузорий *Colpoda steinii* и *Exocolpoda augustini*, полученные из современной тундровой почвы и многолетнемерзлых отложений Арктики голоценового

и позднеплейстоценового возраста. Эти инфузории, как и многие другие почвенные протисты, способны к формированию цист покоя и длительному криптобиозу в неблагоприятных условиях. Предварительный анализ [Shatilovich et al., 2015] показал, что цисты ископаемых цилиат *Colpoda steinii* хуже адаптированы к стрессу высушивания, периодического переохлаждения и замораживания–оттаивания, чем цисты современных тундровых инфузорий того же вида. Для эксперимента также были выбраны два штамма рода *Acanthamoeba*, выделенные из отложений голоценового и позднеплейстоценового возраста. Акантамебы – это наиболее распространенные амебы на Земле, они обитают в почвенных, пресноводных и морских биотопах. В мерзлых отложениях жизнеспособные акантамебы встречаются довольно часто. Выбранные для эксперимента организмы были выделены из многолетнемерзлых отложений голоценового и позднеплейстоценового возраста. Известно, что цисты акантамеб очень устойчивы к неблагоприятным воздействиям и в сухом виде могут сохранять жизнеспособность десятки лет [Sriram et al., 2008].

Ниже приводится список всех организмов, отобранных для эксперимента: цисты *Acanthamoeba* sp., штаммы ам8, ам88; цисты *Colpoda steinii*, штаммы 1086, 7/91, 1019, СС1; цисты *Exocolpoda augustini*, штамм 1/01. Цисты простейших помещали в контейнеры высушенными на мембранных фильтрах и в стерильном каолините, а также в

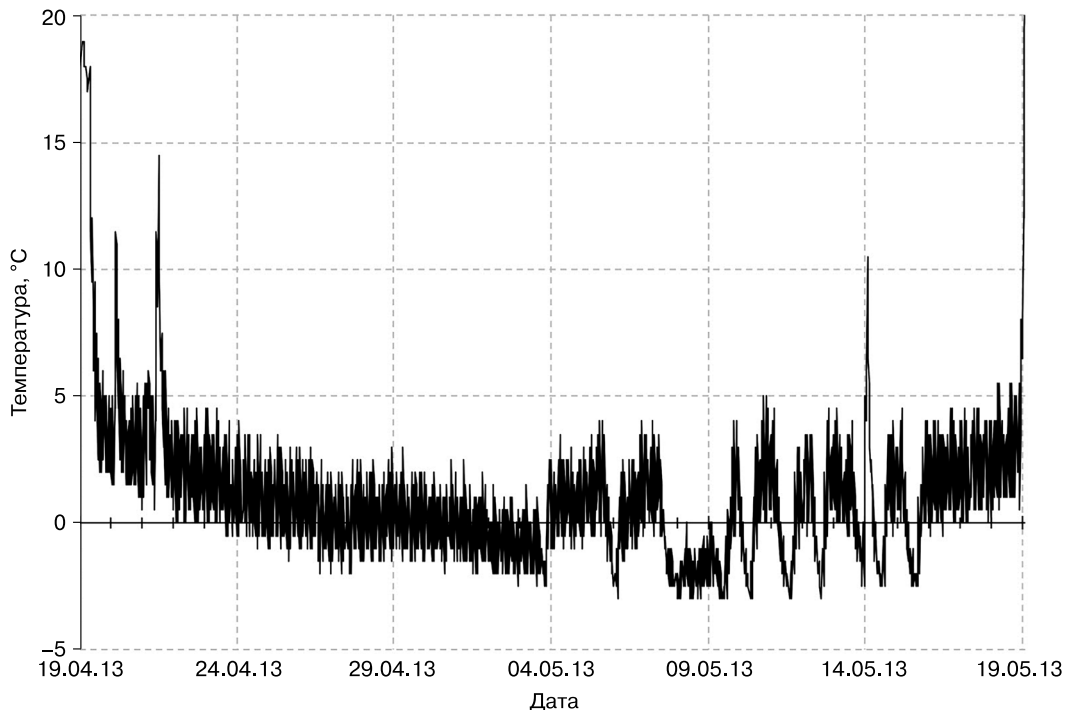


Рис. 2. Температурная кривая, полученная по данным логгеров iButton, установленных внутри контейнеров с образцами.

1.5 мл пробирках с добавлением питательной среды. В ходе всего полета, в предполетный и послеполетный периоды осуществлялся температурный мониторинг с помощью логгеров iButton с шагом 30 мин (рис. 2). Все микробиологические анализы проводились в трехкратной повторности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По ходу температурной кривой за весь период эксперимента (см. рис. 2) можно заключить, что температура внутри контейнеров, размещенных снаружи спутника, в течение всего полета находилась в интервале  $+5...-2$  °C с частыми переходами через нуль, что связано с быстрым вращением космического аппарата вокруг своей оси. Этот же фактор не позволил образцам, участвующим в эксперименте, охладиться до  $-150$  °C и нагреться до  $+125$  °C, как предполагалось перед началом эксперимента. Анализируя фактические данные, можно сделать вывод, что температурный режим во время полета не был экстремальным (абсолютный минимум составил  $-3$  °C, максимум  $+14.5$  °C), хотя за это время произошло несколько сотен переходов температуры через  $0$  °C. Как отмечено выше, измеренные в ходе полета температуры значительно отличаются от расчетных параметров режима полета ( $-150...+125$  °C). Вместе с тем выяснилось, что частый переход температуры через нуль не оказался фатальным для микроорганизмов, участвующих в эксперименте. Надо отметить, что в контейнерах, содержащих сухие культуры, влияние этих многочисленных переходов не было экстремальным фактором для микроорганизмов, так как в отсутствие воды отсутствуют и фазовые переходы.

Результаты послеполетных экспериментов сравнивались с данными анализов, проводимых до полета.

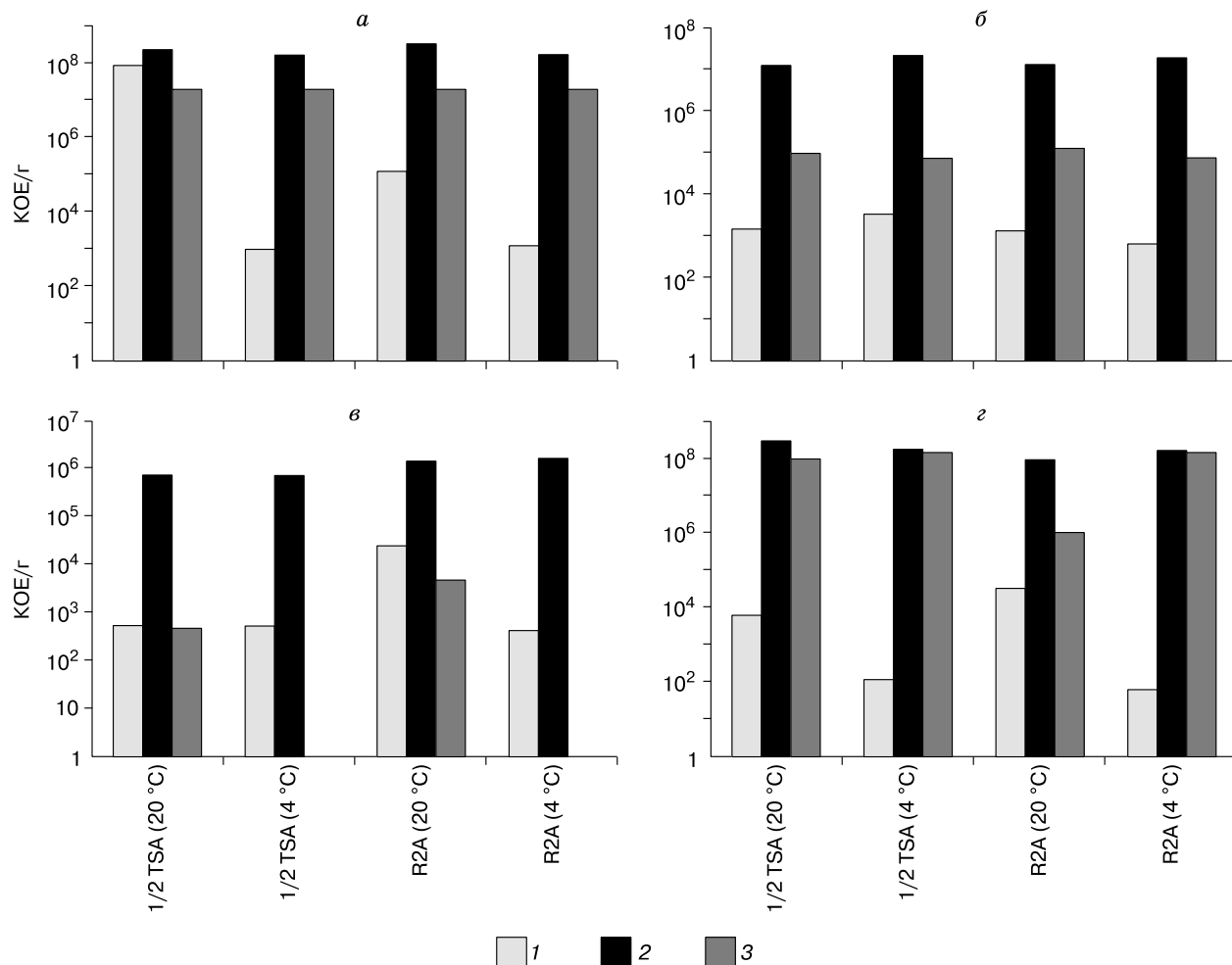
#### Численность культивируемых бактерий

Чашечные высевы из послеполетных (внутри и снаружи биоспутника) и контрольных (нативных) образцов мерзлых пород осуществляли на стандартных питательных средах R2A (Difco, США) и разбавленной в два раза среде TSA (Difco, США), в трехкратной повторности. Инкубирование проводили при температурах  $4$  и  $20$  °C в аэробных условиях. Комбинации питательных сред и температур инкубации (рис. 3, 4) отражают группы аэробных представителей культивируемой части микробного сообщества: среда R2A, при температуре культивирования  $4$  °C выявлены олиготрофы, психрофилы/психротолерантные бактерии; R2A ( $20$  °C) – олиготрофы, мезофилы;  $1/2$  TSA ( $4$  °C) – гетеротрофы, психрофилы/психротолеранты;  $1/2$  TSA ( $20$  °C) – гетеротрофы, мезофилы.

Анализ результатов чашечных посевов позволил выявить различия между контрольными и послеполетными пробами как по числу колониеобразующих единиц на грамм мерзлой породы (КОЕ/г), так и по разнообразию морфотипов колоний в составе микробных сообществ независимо от температуры инкубирования. В частности, в послеполетных пробах, находившихся снаружи биоспутника, появлялось значительное количество пигментированных форм, что может свидетельствовать о существенном воздействии условий космического полета на устойчивость отдельных видов микроорганизмов. Анализ числа КОЕ/г в образцах многолетнемерзлых отложений Арктики в послеполетных пробах внутри спутника и снаружи показал значительное увеличение численности микроорганизмов (до  $2-4$  порядков) по сравнению с контрольным (предполетным) образцом (см. рис. 3). При этом для всех арктических образцов максимальные значения КОЕ/г выявлены только в послеполетных пробах, находившихся внутри биоспутника, независимо от типа питательной среды и температуры инкубации. Скорее всего, комфортный температурный режим и исходная влажность образца создали благоприятные условия для роста и развития микроорганизмов. Исключение составили гетеротрофы и олиготрофы, представляющие психрофильно-психротолерантных представителей микробного сообщества из скв. 4/09 (см. рис. 3, з). При изначально низкой численности ( $10-10^2$  КОЕ/г) в контрольных пробах высокие значения числа КОЕ/г после инкубации при  $4$  °C ( $10^8$  КОЕ/г) для обеих послеполетных проб (внутри и снаружи биоспутника) говорят либо о высокой степени устойчивости этих микроорганизмов к температурным флуктуациям в открытом космосе, либо о благоприятных условиях криоконсервации в ходе формирования мерзлых толщ.

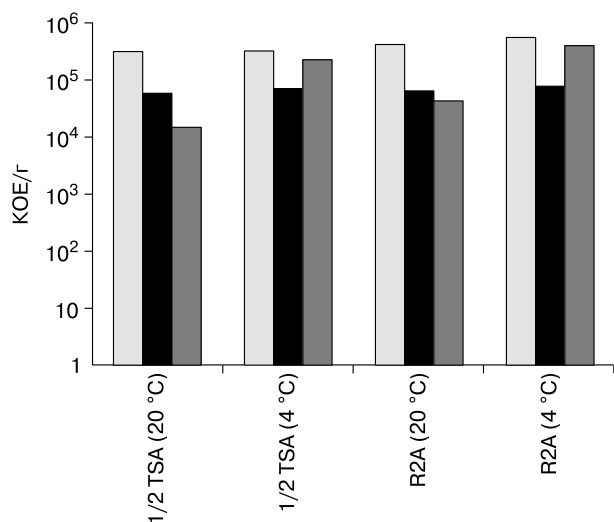
Вместе с тем общая тенденция увеличения численности микроорганизмов в послеполетных пробах, экспонированных открытому космосу (снаружи биоспутника) (см. рис. 3, а, б, з) по сравнению с контрольными, нарушается при исследовании образца из скв. 3/09 (см. рис. 3, в). Показано, что в послеполетной пробе, находившейся внутри спутника, значения КОЕ/г были равны таковым в контрольном образце или снижались на один порядок для мезофильных микроорганизмов, тогда как у бактерий, чьи предпочтения лежат в области низких положительных температур, видимого роста авторы не обнаружили. Вероятно, даже незначительные температурные флуктуации и условия открытого космоса оказались летальными для психрофильно-психротолерантных микроорганизмов этих отложений.

В образцах антарктической почвы, находившихся как снаружи спутника, так и внутри него,



**Рис. 3. Изменение численности микроорганизмов в образцах многолетнемерзлых отложений Арктики в результате космического эксперимента.**

*a* – скв. 2/08; *б* – скв. 3–4/07; *в* – скв. 3/09; *г* – скв. 4/09. На оси абсцисс – среды и температуры, при которых происходило культивирование; 1 – контроль, 2 – внутри спутника, 3 – на внешней оболочке спутника.



наблюдали незначительное (в пределах одного порядка) снижение численности культивируемых микроорганизмов (см. рис. 4). Несмотря на неустойчивость микробного сообщества антарктической почвы к условиям космического полета, наибольшей жизнеспособностью обладали гетеротрофы и олиготрофы с температурами роста, соответствующими психрофильной области.

**Рис. 4. Изменение численности микроорганизмов в образцах многолетнемерзлых отложений современной почвы Антарктиды (Станция Прогресс) в результате космического эксперимента.**

Усл. обозн. см. на рис. 3.

### Анализ ДНК

С целью выделения общей геномной ДНК в работе использовали коммерческий набор “PowerSoil® DNA Isolation Kit” производства MO BIO Laboratories, Inc. (Карлсбад, США). В ходе исследований предложенная производителем процедура экстракции ДНК была модифицирована авторами применительно к образцам многолетне-мерзлых отложений. Измерение концентрации, выделенной ДНК, проводили на спектрофотометре NanoDrop ND 2000. В табл. 2 представлены данные о содержании ДНК в пред- и послеполетном образцах. Из анализа табл. 2 следует, что при общем низком содержании ДНК в образцах многолетней мерзлоты Арктики изменения в послеполетных вариантах эксперимента весьма незначительные. Наибольшей концентрацией ДНК характеризуется современная антарктическая почва, существенное ее снижение в послеполетных пробах по сравнению с контрольным образцом отражает общую тенденцию уменьшения численности КОЕ/г (см. рис. 4), что говорит не только о потере жизнеспособности частью микробной популяции, но и о разрушении некоторой доли суммарной ДНК в послеполетных экспериментах.

### Протисты

Послеполетные анализы инфузорий *Colpoda steinii* и *Exocolpoda augustini* методом LIVE-DEAD-окрашивания выявили, что 70–97 % цист повреждены (рис. 5).

Для цист, находящихся в сухом состоянии во время полета (на мембранных фильтрах и в каолините), увеличилась лаг-фаза, снизилась максимальная скорость роста, а также общая численность цилиат, тогда как для аналогичных образцов цист инфузорий, инкубировавшихся в период полета в пробирках-эппендорфах, отмечено увеличение максимальной скорости роста и общей численности.

В целом послеполетный анализ и сравнение с контрольными образцами показали, что современные тундровые колподоы более устойчивы к воз-

Таблица 2. Концентрация выделенной ДНК в послеполетных и контрольных образцах

№	Скважина	Концентрация геномной ДНК, мкг/г почвы		
		Контрольный, мерзлый образец	Послеполетный образец	
			внутри биоспутника	снаружи биоспутника
1	4/09	0.85	0.69	0.97
2	3/09	0.69	1.20	0.69
3	2/08	0.46	1.25	0.36
4	3–4/07	0.94	0.61	1.21
5	LA56-Pr-04	34.09	7.67	11.07

действию условий космоса, чем ископаемые представители, и что штаммы *Colpoda steinii* более устойчивы к условиям полета, чем штамм *Exocolpoda augustini*.

В результате эксперимента получены данные, свидетельствующие о способности цист почвенных инфузорий сохранять жизнеспособность в условиях космоса. Исследования послеполетных и контрольных образцов цист инфузорий проводились с использованием методов световой, флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии. В качестве диагностических критериев для распознавания живых и мертвых клеток выступали способность цист к эксцистированию, изменение проницаемости мембран и морфологические признаки некроза клетки. Прижизненное флуоресцентное LIVE-DEAD-окрашивание клеток (см. рис. 5) с использованием красителей акридин оранж (АО) и пропидий йодид (PI) выявило высокую долю мертвых цист в послеполетных образцах (70–97 % от контроля).

Культивирование послеполетных и контрольных образцов цист проводили на жидкой минеральной среде РJ с добавлением *E. coli* при 22 °С в течение недели. Из анализа кривых роста следует, что в культурах, полученных из образцов цист, находившихся в сухом состоянии во время полета (на мембранных фильтрах и в каолините), увеличилась лаг-фаза, снизилась максимальная ско-

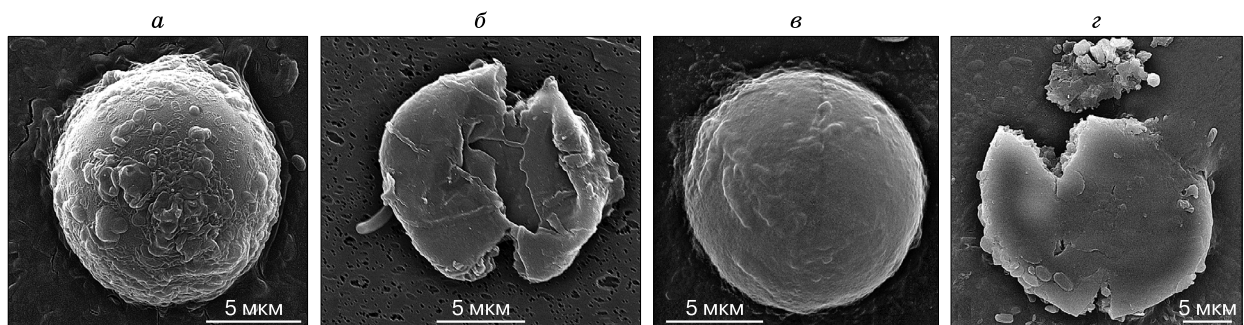


Рис. 5. Цисты инфузорий *Exocolpoda augustini* (а, б) и *Colpoda steinii* (в, г):

а, в – контрольные образцы; б, г – поврежденные цисты из постполетных образцов. Сканирующий электронный микроскоп.

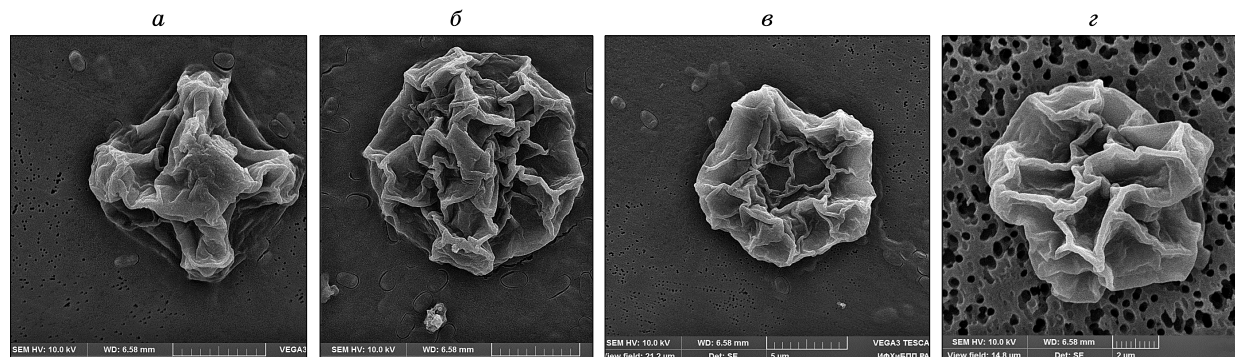


Рис. 6. Цисты акантамеб, штамм ам8 (сканирующий электронный микроскоп).

а–в – после космического полета; г – контроль (зрелая циста).

рость роста и общая численность цилиат по сравнению с контролем. Доля живых цист была выше в культурах, инкубируемых в течение полета в жидкой культуральной среде, что косвенно свидетельствует о наличии в покоящихся клетках процессов репарации ДНК. Исследование морфологии цист с использованием сканирующей электронной микроскопии показало, что некоторые цисты из послеполетных образцов имеют значительные повреждения стенки, причина которых пока неясна.

Послеполетный анализ акантамеб *Acanthamoeba* sp. (штаммы ам8 и ам88) из многолетне-мерзлых отложений позднелейстоценового возраста Колымской низменности показал сохранение жизнеспособных цист как при инкубировании их во влажной среде (PJ), так и при сухом инкубировании в каолините и на фильтрах. После полета во всех вариантах опыта (цисты сухие на фильтре и на каолините, цисты на влажном каолините и цисты в жидкой среде PJ) присутствовали жизнеспособные цисты, способные к эксцистированию. Цисты эксцистировались на второй день во всех вариантах лабораторных условий, как на жидких средах PJ и CPJ, так и на агаризованных средах APJ и ACPJ при 20 и 30 °С. На микрофотографиях сканирующей электронной микроскопии цисты акантамеб, побывавшие в космосе (рис. 6, а–в), выглядят неповрежденными и типичными для зрелой цисты (см. рис. 6, г). Сохранность цист в условиях космического эксперимента хорошо согласуется с данными аналогичных экспериментов о сохранности эндоспор бактерий [Rivkina et al., 2007; Horneck et al., 2012].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперимент “Экзобиофрост” на биоспутнике БИОН-М1 показал, что значительная часть микроорганизмов вечномерзлых пород сохраняет жизнеспособность после орбитального космичес-

кого полета. Ни воздействие температурных перепадов, ни ионизирующее излучение, ни перегрузки не привели к полной стерилизации образцов. То обстоятельство, что почти во всех образцах мерзлоты наблюдалось увеличение КОЕ/г в послеполетных образцах по сравнению с контролем, можно объяснить возможностью развития микроорганизмов в пред- и послеполетный периоды, когда пробы находились в условиях положительных температур. При этом сам факт сохранения микроорганизмами жизнеспособности после полета не вызывает сомнения. Анализ поведения цист протистов в целом выявил неустойчивость инфузорий из вечной мерзлоты к условиям полета, хотя представители *Colpoda steinii* оказались относительно более устойчивыми, чем штамм *Exocolpoda augustini*. В то же время акантамеба *Acanthamoeba* sp. продемонстрировала устойчивость к условиям полета и может быть рассмотрена как перспективный модельный организм для дальнейших экспериментов как в космическом пространстве, так и на Земле.

Участие в эксперименте “Экзобиофрост” поддержано договором № 349 с СКБ КП ИКИ РАН, лабораторные исследования выполнялись при поддержке государственного задания АААА-А18-118013190181-6, КП 274 и КП 280.

### Литература

- Гиличинский Д.А., Федоров-Давыдов Д.Г., Чайковская Н.Р. и др. Влияние криогенеза на микробные сообщества почв // Геокриологические исследования / Под ред. Э.Д. Ершова. М., Изд-во Моск. ун-та, 1991, с. 158–180.
- Губин С.В., Лупачев А.В., Шатилович А.В. и др. Влияние криогенного массообмена на распределение жизнеспособной микрофауны в профилях криоземов // Почвоведение, 2016, № 12, с. 1485–1490.
- Демидов Н.Э., Гиличинский Д.А., Миронов В.А., Шамакова Л.А. Криобиосфера Земли и поиск жизни на Марсе // Криосфера Земли, 2012, т. XVI, № 4, с. 67–82.



- Шмакова Л.А., Ривкина Е.М.** Живые эукариоты типа амоебозоа из многолетнемерзлых отложений Арктики // Палеонтол. журн., 2015, № 6, с. 14–19.
- Battista J.R.** Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans* // *Ann. Rev. Microbiol.*, 1997, vol. 51 (1), p. 203–224.
- Cameron R.E., Morelli F.A.** Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor Valley drill core // *Antarct. J. US*, 1974, vol. 9, p. 113–116.
- Cheptsov V., Vorobyova E., Belov A. et al.** Survivability of soil and permafrost microbial communities after irradiation with accelerated electrons under simulated Martian and open space conditions // *Geosciences*, 2018, vol. 8 (8), p. 298.
- Crick F.H., Orgel L.E.** Directed Panspermia // *Icarus*, 1973, vol. 19 (3), p. 341–348.
- Friedmann E.I.** Permafrost as microbial habitat // *Viable Microorganisms in Permafrost* / D.A. Gilichinsky (Ed.). Pushchino, Russian Academy of Sciences, 1994, p. 21–26.
- Gilichinsky D., Wilson G., Friedmann E.I. et al.** Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology // *Astrobiology*, 2007, vol. 7 (2), p. 275–311.
- Gilichinsky D.A., Rivkina E.M.** Permafrost microbiology // *Encyclopedia of Geobiology* / J. Reitner, V. Thiel (Eds.). Dordrecht, Springer-Verlag, 2011, p. 726–732.
- Gilichinsky D.A., Soina V.S., Petrova M.A.** Cryoprotective properties of water in the Earth cryolithosphere and its role in exobiology // *Origins Life and Evol. Biosphere*, 1993, vol. 23 (1), p. 65–75.
- Gilichinsky D.A., Wagener S., Vishnivetskaya T.A.** Permafrost microbiology // *Permafrost and Periglacial Processes*, 1995, vol. 6, p. 281–291.
- Gilichinsky M., Demidov N., Rivkina E.** Morphometry of volcanic cones on Mars in perspective of astrobiological research // *Intern. J. Astrobiol.*, 2015, vol. 14 (4), p. 537–545.
- Horneck G., Moeller R., Cadet J. et al.** Resistance of bacterial endospores to outer space for Planetary Protection Purposes—Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // *Astrobiology*, 2012, vol. 12, p. 445–456.
- Morita R.** Low-temperature environments // *Encyclopedia of Microbiology* / J. Lederberg (Ed.). New York, Academic, 2000, vol. 3 L–P, p. 93–98.
- Olsson-Francis K., Cockell C.S.** Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments // *J. Microbiol. Methods*, 2010, vol. 80 (1), p. 1–13.
- Retberg P., Eschweiler U., Strauch K. et al.** Survival of microorganisms in space protected by meteorite material: Results of the experiment ‘EXOBIOLOGIE’ of the PERSEUS mission // *Advances Space Res.*, 2002, vol. 30, p. 1539–1545.
- Rivkina E.M., Friedmann E.I., McKay C.P., Gilichinsky D.A.** Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, No. 8, p. 3230–3233.
- Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichuis K. et al.** Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, vol. 61, p. 1–15.
- Rivkina E., Abramov A., Spirina E. et al.** Earth’s perennially frozen environments as a model of cryogenic planet ecosystems // *Permafrost and Periglacial Processes*, 2018, vol. 29 (4), p. 246–256.
- Shatilovich A., Stoupin D., Rivkina E.** Ciliates from ancient permafrost: assessment of cold resistance of the resting cysts // *Europ. J. Protistol.*, 2015, vol. 51 (3), p. 230–240.
- Soina V., Vorobyova E.** Adaptation of bacteria to the terrestrial permafrost environment: A biomodel for astrobiology // *Origins, Genesis, Evolution and Biodiversity of Life, Series: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* / J. Seckbach (Ed.). Dordrecht, Netherlands, 2004, vol. 6, p. 427–444.
- Spirina E.V., Fyodorov-Davydov D.G.** Microbiological characterization of cryogenic soils in the Kolymskaya Lowland // *Eurasian Soil Sci.*, 1998, vol. 31, p. 1331–1344.
- Sriram R., Megan S., Gregory B. et al.** Survival of *Acanthamoeba* Cysts after desiccation for more than 20 years // *J. Clinical Microbiol.*, 2008, vol. 12 (46), p. 4045–4048.
- Vorobyova E., Soina V., Mulukin A.** Microorganisms and enzyme activity in permafrost after removal of long-term cold stress // *Advances Space Res.*, 1996, vol. 18, p. 103–108.
- Vorobyova E.A., Cheptsov V.S., Osipov G.A. et al.** Gamma-IR resistance of bacteria in soil and permafrost // *Paleontol. J.*, 2018, vol. 52 (10), p. 1204–1216.
- Wickramasinghe N.C., Wickramasinghe D.T., Steele E.J.** Comets, Enceladus and panspermia // *Astrophys. and Space Sci.*, 2018, vol. 363 (12), p. 244.

## References

- Gilichinsky D.A., Fyodorov-Davydov D.G., Tchaikovskaya N.R. et al. The effect of cryogenesis on microbial communities in soils. In: E.D. Ershov (Ed.). *Geokriologicheskie issledovaniya* [Geocryological Studies]. Moscow, Moscow University Press, 1991, p. 158–180 (in Russian).
- Gubin S.V., Lupachev A.V., Shatilovich A.V., Ryss A., Myl’nikov A.P., Veremeeva A. The influence of cryogenic mass exchange on the distribution of viable microfauna in cryozems. *Eurasian Soil Science*, 2016, vol. 49 (12), p. 1400–1413.
- Demidov N.E., Gilichinsky D.A., Mironov V.A., Shmakova L.A. Cryobiosphere of Earth and the search of life on Mars. *Kriosfera Zemli* [Earth’s Cryosphere], 2012, vol. XVI, No. 4, p. 67–82 (in Russian).
- Shmakova L.A., Rivkina E.M. Viable eukaryotes of the filum Amoebozoa from the Arctic permafrost. *Paleontological J.*, 2015, No. 49 (6), p. 572–577.
- Battista J.R. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1997, vol. 51 (1), p. 203–224.
- Cameron R.E., Morelli F.A. Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor Valley drill core. *Antarct. J. US*, 1974, vol. 9, p. 113–116.
- Cheptsov V., Vorobyova E., Belov A., Pavlov A., Tsurkov D., Lomasov V., Bulat S. Survivability of soil and permafrost microbial communities after irradiation with accelerated electrons under simulated Martian and open space conditions. *Geosciences*, 2018, vol. 8 (8), p. 298.
- Crick F.H., Orgel L.E. Directed Panspermia. *Icarus*, 1973, vol. 19 (3), p. 341–348.
- Friedmann E.I. Permafrost as microbial habitat. In: *Viable Microorganisms in Permafrost* / D.A. Gilichinsky (Ed.). Pushchino, Russian Academy of Sciences, 1994, p. 21–26.
- Gilichinsky D., Wilson G., Friedmann E.I. et al. Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology*, 2007, vol. 7 (2), p. 275–311.
- Gilichinsky D.A., Rivkina E.M. Permafrost microbiology. In: *Encyclopedia of Geobiology* / J. Reitner, V. Thiel (Eds.). Dordrecht, Springer-Verlag, 2011, p. 726–732.

- Gilichinsky D.A., Soina V.S., Petrova M.A. Cryoprotective properties of water in the Earth cryolithosphere and its role in exobiology. *Origins Life and Evol. Biosphere*, 1993, vol. 23 (1), p. 65–75.
- Gilichinsky D.A., Wagener S., Vishnivetskaya T.A. Permafrost microbiology. *Permafrost and Periglacial Processes*, 1995, vol. 6, p. 281–291.
- Gilichinsky M., Demidov N., Rivkina E. Morphometry of volcanic cones on Mars in perspective of astrobiological research. *Intern. J. Astrobiol.*, 2015, vol. 14 (4), p. 537–545.
- Horneck G., Moeller R., Cadet J. et al. Resistance of bacterial endospores to outer space for Planetary Protection Purposes—Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission. *Astrobiology*, 2012, vol. 12, p. 445–456.
- Morita R. Low-temperature environments. In: *Encyclopedia of Microbiology* / J. Lederberg (Ed.). New York, Academic, 2000, vol. 3 L–P, p. 93–98.
- Olsson-Francis K., Cockell C.S. Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments. *J. Microbiol. Methods*, 2010, vol. 80 (1), p. 1–13.
- Rettberg P., Eschweiler U., Strauch K. et al. Survival of microorganisms in space protected by meteorite material: Results of the experiment ‘EXO BIOLOGIE’ of the PERSEUS mission. *Advances Space Res.*, 2002, vol. 30, p. 1539–1545.
- Rivkina E.M., Friedmann E.I., McKay C.P., Gilichinsky D.A. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, No. 8, p. 3230–3233.
- Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichuis K. et al. Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, vol. 61, p. 1–15.
- Rivkina E., Abramov A., Spirina E. et al. Earth’s perennially frozen environments as a model of cryogenic planet ecosystems. *Permafrost and Periglacial Processes*, 2018, vol. 29 (4), p. 246–256.
- Shatilovich A., Stoupin D., Rivkina E. Ciliates from ancient permafrost: assessment of cold resistance of the resting cysts. *Europ. J. Protistol.*, 2015, vol. 51 (3), p. 230–240.
- Soina V., Vorobyova E. Adaptation of bacteria to the terrestrial permafrost environment: A biomodel for astrobiology. In: *Origins, Genesis, Evolution and Biodiversity of Life, Series: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* / J. Seckbach (Ed.). Dordrecht, Netherlands, 2004, vol. 6, p. 427–444.
- Spirina E.V., Fyodorov-Davydov D.G. Microbiological characterization of cryogenic soils in the Kolymskaya Lowland. *Eurasian Soil Sci.*, 1998, vol. 31, p. 1331–1344.
- Sriram R., Megan S., Gregory B. et al. Survival of Acanthamoeba Cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clinical Microbiol.*, 2008, vol. 12 (46), p. 4045–4048.
- Vorobyova E., Soina V., Mulukin A. Microorganisms and enzyme activity in permafrost after removal of long-term cold stress. *Advances Space Res.*, 1996, vol. 18, p. 103–108.
- Vorobyova E.A., Cheptsov V.S., Osipov G.A., Kotsyurbenko O.R. Gamma-IR resistance of bacteria in soil and permafrost. *Paleontol. J.*, 2018, vol. 52 (10), p. 1204–1216.
- Wickramasinghe N.C., Wickramasinghe D.T., Steele E.J. Comets, Enceladus and panspermia. *Astrophys. and Space Sci.*, 2018, vol. 363 (12), p. 244.

*Поступила в редакцию 31 января 2019 г.,  
после доработки – 20 июня 2019 г.,  
принята к публикации 27 июня 2019 г.*