

## ТЕРМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В ПОЧВАХ КАК РЕЗУЛЬТАТ ХОЗЯЙСТВЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА В ДРЕВНОСТИ

© 2019 г. Е. В. Чернышева<sup>а, \*</sup>, Н. Н. Каширская<sup>а</sup>, Е. В. Демкина<sup>б</sup>, Д. С. Коробов<sup>с</sup>, А. В. Борисов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований” Российской академии наук, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения, Пушкино, 142290 Россия

<sup>б</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071 Россия

<sup>с</sup>Институт археологии Российской академии наук, Москва, 117292 Россия

\*e-mail: chernysheva1988@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2019 г.

После доработки 29.04.2019 г.

Принята к публикации 29.05.2019 г.

DOI: 10.1134/S0026365619050045

Термофильные микроорганизмы в почвах на сегодняшний день изучены в меньшей степени, по сравнению с термофильными микробными сообществами экстремальных мест обитания (Бонч-Осмоловская, 2004). По современным данным в естественных целинных почвах умеренных широт численность термофилов составляет  $1.5\text{--}8.8 \times 10^4$  КОЕ/г почвы (Marchant et al., 2002). Близкие показатели характерны и для почв пустынной зоны; несмотря на то, что температура почвы здесь может достигать  $60^\circ\text{C}$ , численность термофильных микроорганизмов варьирует в пределах от  $5 \times 10^2$  до  $3 \times 10^4$  КОЕ/г почвы (Okoro et al., 2009; Aanniz et al., 2015).

В почвах численность этой группы микроорганизмов может существенно изменяться в результате сельскохозяйственного освоения территории (Мишустин, 1950). Показано, что наиболее вероятные источники поступления этих микроорганизмов в почву — это навоз и компост, которые вносятся на поля в качестве органических удобрений. Разложение органических материалов сопровождается экзотермическими реакциями. На этой стадии получают преимущества термофильные микроорганизмы, адаптированные к размножению и развитию при высоких температурах. По мере исчерпания субстрата активность термофильных микроорганизмов уменьшается, и температура компоста начинает снижаться (Patchaye et al., 2018). В этот момент начинается активный процесс спорообразования. Споры термофильных микроорганизмов в дальнейшем могут попадать в почву и сохраняться в ней неопределенно долгий период времени.

В последние десятилетия было показано, что микроорганизмы способны выживать в почвах на

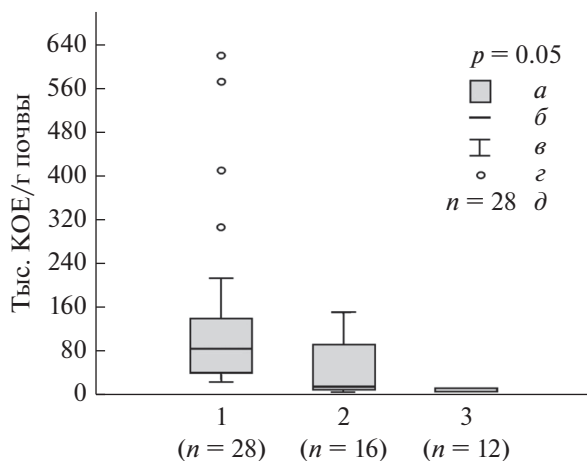
протяжении нескольких тысяч лет и сохранять способность формировать колонии на чашках Петри при стандартных условиях. В первую очередь это относится к микроорганизмам, выделенных из образцов мерзлотных отложений (Antibus et al., 2012; Selbmann et al., 2010).

Следует отметить, что использование навоза имеет многотысячелетнюю историю. Так, на территории современной Шотландии на поселениях возрастом более шести тысяч лет были выявлены хозяйственные ямы, которые использовались для компостирования органических отходов, а в Месопотамии начали использовать навоз в качестве удобрений около десяти тысяч лет назад (Patchaye et al., 2018).

При этом до настоящего времени не дана оценка вклада древней антропогенной деятельности в распространение термофильных микроорганизмов в почвах. Очевидно, ответить на этот вопрос можно, изучив микробные сообщества почв в окрестностях археологических памятников. Решению этого вопроса посвящена настоящая работа.

Проведена оценка численности термофильных микроорганизмов в почвах следующих объектов:

1. Загоны для скота в горной зоне Северного Кавказа. Согласно археологическим данным, загоны использовались в эпоху бронзы (I тыс. до н.э.) и в раннем Средневековье (I тыс. н.э.). Мощность почвенного профиля в загонах варьировала от 50 до 120 см. На различной глубине всегда залегала погребенная почва, в которой обнаружилось значительное количество керамики, что позволило четко устанавливать время функционирования загона (Чернышева и соавт., 2017). В ряде



**Рис. 1.** Численность термофильных бактерий в почвах археологических памятников: 1 – загоны для скота; 2 – древние земельные поля; 3 – фоновые почвы. Обозначения: а – межквартильное расстояние; б – медиана; в – min–max; z – выброс; d – число наблюдений.

случаев зафиксирован факт использования загонов в советское время. Всего было исследовано семь загонов.

2. Почвы древних сельскохозяйственных угодий. Исследованы две группы объектов – почвы полей в окрестностях средневековых поселений и почвы сельскохозяйственных террас в горном Дагестане. Для изучения свойств почв средневековых полей была заложена серия из 11 почвенных разрезов на разном удалении от поселения, функционирующего в V–VIII вв. н.э. Особо отметим, что на средневековых полях имел место только один период использования: ни до этого времени, ни после, никакой сельскохозяйственной деятельности на данной территории не осуществлялось (Борисов, Коробов, 2014). Использование почвы сельскохозяйственной террасы в горном Дагестане началось в XI–XII вв. н.э. и не прерывалось до середины XIX в. В результате сформировался профиль агрозома мощностью свыше двух метров.

Параллельно в непосредственной близости от вышеуказанных объектов исследовались современные фоновые почвы, для которых достоверно было установлено отсутствие антропогенного воздействия в прошлом.

Численность культивируемых аэробных организмов определяли методом посева почвенной суспензии из разведений на агаризованную глюкозопептонно-дрожжевую среду (Добровольская и соавт., 1989). Посевы инкубировали при 60°C в течение одних суток. Из отдельных колоний были получены четыре чистые культуры микроорганизмов, для идентификации которых был проведен анализ нуклеотидной последовательности ге-

на 16S рРНК. Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК было проведено Центром коллективного пользования “Биоинженерия” ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

Установлено, что численность указанных термофильных микроорганизмов в почвах загонов для скота достигала 570–620 тыс. КОЕ/г почвы, в то время как в современных фоновых почвах их численность не превышала 90 тыс. КОЕ/г почвы (рис. 1).

В почвах полей в окрестностях средневековых поселений численность термофильных бактерий существенно уменьшалась по мере удаления от поселения (рис. 1). В ближайших к поселению почвах их численность составила около 150 тыс. КОЕ/г почвы, а на расстояние более 2000 м уже не превышала 1 тыс. КОЕ/г почвы (Чернышева и соавт., 2017). Повышенная численность термофильных микроорганизмов зафиксирована на расстоянии до 500–700 м от поселения. Таким образом, можно предположить, что высокая численность термофильных микроорганизмов в почвах указывает на активное применение навоза в сельскохозяйственной практике в прошлом.

В почвах сельскохозяйственных террас в горном Дагестане, использование и рост профиля которой не прерывался на протяжении 800 лет, четко выделяются слои с высокой и низкой численностью термофильных микроорганизмов, что, по-видимому, отражает особенности унавоживания в разные исторические периоды.

Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что два штамма, выделенных из слоя XVII века почвы сельскохозяйственной террасы относятся к спорообразующим, умеренно термофильным бактериям рода *Anoxybacillus* (штамм AT1 на 97.2% идентичен *Anoxybacillus vitaminiphilus* 3nP4; штамм AT2 на 99.9% идентичен *Anoxybacillus calidus* C161ab). Из средневекового слоя почвы загона выделен штамм, относящийся к роду *Parageobacillus*, облигатных термофильных спорообразующих бактерий (штамм CE1 на 98.9% идентичен *Parageobacillus toebii* R-35642). Из этого же образца выделен штамм, относящийся к роду термофильных актиномицетов *Thermoactinomyces* (штамм CE2 на 99.9% идентичен *Thermoactinomyces vulgaris* KCTC 9076). Примечательно, что ранее жизнеспособные споры *T. vulgaris* были выделены из слоя озерных отложений, где их происхождение связывали с сельскохозяйственным освоением территории в эпоху Средневековья (Nilsson, Renberg, 1990).

Таким образом, учитывая тот факт, что количество древних и средневековых поселений только на территории европейской части нашей страны измеряется сотнями тысяч (только в период 2009–2012 гг. открыто свыше 15000 новых памят-

ников; Макаров и соавт., 2016), и принимая во внимание, что каждое поселение имело свою земледельческую периферию, где практиковалось внесение органических удобрений, мы вправе сделать предположение о ведущей роли хозяйственной деятельности человека в распространении термофильных микроорганизмов в почвах.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме государственного задания № 0191-2019-0046 и № 0104-2019-0005. Микробиологические исследования выполнены за счет средств гранта МК-2325.2019.6. Анализ последовательности гена 16S рРНК выполнен за счет средств гранта РФ № 17-78-10207.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бонч-Осмоловская Е.А. Изучение термофильных микроорганизмов в Институте микробиологии РАН // Микробиология. 2004. Т. 73. № 5. С. 644–658.

Bonch-Osmolovskaya E.A. Studies of thermophilic microorganisms at the Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences // Microbiology (Mikrobiologiya). 2004. V. 73. P. 551–564.

Борисов А.В., Коробов Д.С. Древнее и средневековое земледелие в Кисловодской котловине: итоги почвенно-археологических исследований. М.: Таус, 2013. 272 с.

Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1989. 40 с.

Макаров Н.А., Зеленцова О.В., Коробов Д.С., Черников А.П., Ворошилов А.Н. Россия как археологическое пространство: первые итоги работы по созданию национальной географо-информационной системы “Археологические памятники России” // Российская археология. 2016. № 4. С. 5–15.

Мишустин Е.Н. Термофильные микроорганизмы в природе и практике. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. 391 с.

Чернышева Е.В., Борисов А.В., Коробов Д.С. Биологическая память почв и культурных слоев археологических памятников. М.: ГЕОС, 2016. 240 с.

Aanniz T., Ouadghiri M., Melloul M., Swings J., Elfahime E., Ibjibijen J., Ismaili M., Amar M. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. P. 443–453.

Antibus D.E., Leff L.G., Hall B.L., Baeseman J.L., Blackwood C.B. Cultivable bacteria from ancient algal mats from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // Extremophiles. 2012. V. 16. P. 105–114.

Marchant R., Banat I.M., Rahman T.J., Berzano M. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments // Environ. Microbiol. 2002. V. 4. P. 595–602.

Nilsson M., Renberg I. Viable endospores of *Thermoactinomyces vulgaris* in lake sediments as indicators of agricultural history // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2025–2028.

Okoro C.K., Brown R., Jones A.L., Andrews B.A., Asenjo J.A., Goodfellow M., Bull A.T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 95. P. 121–133.

Patchay M., Sundarkrishnan B., Tamilselvan S., Sakthivel N. Microbial management of organic waste in agroecosystem // Microorganisms for Green Revolution. V. 2: Microbes for Sustainable Agro-Ecosystem / Eds. Panpatte D.G., Jhala Y.K., Shelat H.N., Vyas R.V. Singapore: Springer, 2018. P. 45–74.

Selbmann L., Zucconi L., Ruisi S., Grube M., Cardinale M., Onofri S. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance // Polar Biol. 2010. V. 33. P. 71–83.

## Thermophilic Microorganisms in Soils as a Result of Ancient Human Activity

E. V. Chernyshova<sup>a,\*</sup>, N. N. Kashirskaya<sup>a</sup>, E. V. Demkina<sup>b</sup>, D. S. Korobov<sup>c</sup>, and A. V. Borisov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Pushchino, 142290 Russia

<sup>b</sup>Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>c</sup>Institute of Archeology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117292 Russia

\*e-mail: chernysheva1988@gmail.com

Received April 8, 2019; revised April 29, 2019; accepted May 29, 2019