



проект РФФИ 17-29-04257

## **Археологическая микробиология: теория и практика выявления исходного присутствия органических материалов в археологических исследованиях**

### **АННОТАЦИЯ**

Разработаны теоретические основы и методическая база нового междисциплинарного научного направления – археологической микробиологии, предметом изучения которой являются особенности использования органических материалов в бытовой, производственной деятельности и в погребальном обряде древнего населения. Получен обширный фактический материал по закономерностям изменений структуры и численности почвенного микробного сообщества, а также ферментативной активности в случае исходного присутствия в почве субстратов белковой, липидной и полисахаридной природы в различных археологических контекстах. За отчетный период выявлены статистически значимые закономерности использования изделий из шерсти в погребальном обряде различных археологических культур эпохи бронзы и раннего железа. Впервые в практике отечественных и зарубежных исследований разработан и успешно опробован на большом массиве объектов новый методический подход, позволяющий выявлять исходное присутствие жиров и крахмала в горшках из курганных погребений на основе анализа активности ферментов липазы и амилазы. Впервые показана высокая активность липазы в периферийной зоне очагов в культурном слое поселений эпохи бронзы, что открывает возможность выявления мест приготовления пищи. Разработан комплекс микробиологических индикаторов, позволяющих выявлять места содержания скота и места накопления навоза на древних поселениях и средневековых памятниках разного типа. Впервые доказана ведущая роль древней антропогенной деятельности в распространении термофильных микроорганизмов при окультуривании и удобрении почвы. Разрабатывается концепция древнего антропогенного загрязнения почв. Впервые с помощью этого метода локализована хозяйственная скотоводческая зона между оборонительными линиями средневековых укреплений. В настоящее время ведутся работы по выявлению дрожжей в погребальных сосудах, а также иных видов микроорганизмов, которые использовались для ферментации продуктов.

Борисов А.В., Каширская Н.Н, Хомутова Т.Э., Чернышева Е.В. Душанова К.С.  
*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН*

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **Планшетный метод реконструкции исходного присутствия жира и крахмала в грунте из различных археологических контекстов.**

Метод впервые разработан в рамках данного проекта.

Основан на количественном определении активности ферментов липазы и амилазы. В работе использовали два субстрата для определения липазной активности: 4-нитрофенил бутират, с короткой углеродной цепью – четыре атома углерода и 4-нитрофенил пальмитат, с длинной углеродной цепью – 16 атомов углерода.

Описание методики. К одному грамму грунта приливали 60 мл воды. Встряхивали 30 минут на магнитной качалке при скорости 600 оборотов. Затем давали отстояться в холодильнике в течение 30 минут. Раскапали в планшеты 50 мкл раствора модифицированного универсального буфера с оптимальным рН для каждого фермента (для липазы и амилазы рН=7.0). Для приготовления буфера в колбу на один литр отвешивали 12.1 г трис(гидрокси)аминометана, 11.6 г малеиновой кислоты и 6.3 г борной кислоты. Далее растворяли в 488 мл 1 М раствора NaOH и доводили до метки. Для приготовления рабочего буфера смешивали 200 мл маточного раствора и 500 мл дистиллированной воды. До нужного значения рН доводили растворами NaOH и NaCl. В планшет к буферу прилили 50 мкл субстрата и 100 мкл почвенной суспензии. Субстраты для липазы (в этиловом спирте) – 4-нитрофенил бутират (липаза С4) и 4-нитрофенил пальмитат (липаза С16), для амилазы – 2-хлоро-4-нитрофенил-β-D-мальтотриозид (реактивы Sigma Aldrich). Концентрацию субстратов подбирали экспериментально для липазы – 0.5 мМ, для амилазы – 5 мМ. Параллельно ставили контроли: почва без субстрата и субстрат без почвы. Определение проводили в четырех повторностях. Шкала калибровочных растворов готовится из 10 мМ раствора п-нитрофенола, использовали следующие количества мМ п-нитрофенола: 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, в 50 такого мкл раствора содержится 0.75, 1.50, 3.0, 6.25, 12.5, 25 нмоль п-нитрофенола/250 мкл. Для калибровки в планшет раскапывали 100 мкл калибровочного раствора и 100 мкл почвенной суспензии. Плашки с почвенной суспензией инкубировали при 30°C в течение 20 часов. После инкубации приливали 50 мкл 0.5 М NaOH для прекращения ферментативной реакции. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере xMark фирмы Bio-Rad при длине волны 410 нм.

Ферментативную активность выражали в нмоль п-нитрофенола на г почвы в час.

### **2. Аппликационный метод для выявления исходного присутствия шерсти в погребениях**

Аппликационный метод оценки численности грибов, разлагающих шерсть, заключается в нанесении суспензии погребального грунта на диск, изготовленный из шерстяной ткани. Ткань предварительно была обработана 36% соляной кислотой и паром, для быстрого усвоения субстрата кератинофильными грибами и образования полноценных грибных колоний в течение 4 – 7 дней. Для выявления обилия кератинолитических грибов полотно шерстяной ткани обрабатывались органическим растворителем – гексаном в течение 1 часа для удаления липидных примесей. После высушивания ткань выдерживали в течение 1 часа в 36% соляной кислоте при 25 °С, многократно промывали до нейтрального рН и автоклавировали. Из полученного

материала изготавливали диски диаметром 90 мм, по диаметру чашек Петри. Диски выравнивали утюгом и вторично стерилизовали в сухожаровом шкафу при температуре 160 °С в течение 3 часов. Для оценки действия автоклавирования и сухого жара на усвояемость шерстяного субстрата микроорганизмами, отдельно стерилизовали шерстяную ткань, обезжиренную гексаном, но без обработки соляной кислотой. Готовые шерстяные диски увлажняли стерилизованной водопроводной водой и помещали в стерильные пластиковые чашки Петри.

Для приготовления почвенной суспензии навеску грунта 1 г помещали в стерильную фарфоровую ступку. Из колбы, содержащей 100 мл стерильной воды, к почве приливали одну каплю (100 – 200 мкл). Полученную пасту растирали пальцем в стерильной перчатке до полного разрушения структурных агрегатов, затем количественно переносили в колбы со стерильной водопроводной водой. Получали почвенную суспензию II разведения (1 г грунта в 100 мл воды). На подготовленный шерстяной диск, уложенный в чашку Петри, наносили 1 мл полученной суспензии и растирали шпателем. Чашки Петри закрывали и помещали в стерильные пластиковые пакеты с кусочком ваты, смоченным в стерильной воде для поддержания влажности.

Рост грибов на шерстяном субстрате продолжался в течение 4 – 7 дней в термостате при температуре 26°С. После счета грибных колоний на шерстяных дисках, рассчитывали численность КОЕ на 1 г грунта. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

### **3. Комплексный метод для реконструкции мест содержания скота на древних поселениях**

Комплексный методический подход, сочетающий традиционные методы исследований и новые авторские разработки. В данном варианте впервые использован при выполнении данного проекта.

Метод включает последовательный анализ следующего комплекса показателей. Содержание воды в почве (W) измеряли гравиметрически путем взвешивания образца почвы, высушивания его в печи при 105 °С в течение 24 часов. Почвенный органический углерод (SOC) измеряли с использованием метода окисления дихромата. Объемное содержание фосфора определяли с помощью рентгенофлуоресцентного спектрофотометра (СПЕКТРОСКАН МАКС-ГВТМ, Россия). Определение концентраций в почве осуществлялось путем измерения массовой доли металлов и оксидов металлов в порошковых образцах. Перед измерением образцы почвы были высушены и измельчены до размера частиц около 50 микрон. Измельченный образец (200 мг) прессовали в таблетки, которые анализировали в спектрометре.

Микробную биомассу (дцДНК) определяли методом прямого выделения-количественного определения ДНК почвы (Fornasier et al., 2014). Определение количества термофильных микроорганизмов проводили чашечным методом в авторской модификации применительно к почвам археологических памятников (Чернышева и др., 2017).

Активность ферментов определяли в почвенных экстрактах с использованием белка для десорбции ферментов (гетеромолекулярный обмен) из почвенного матрикса (Fornasier and Margon 2007). Для анализа 250 мг сухого образца, измельченного для прохождения через сито 250 мкм, помещали в пробирку Эппендорфа объемом 2 мл и

смешивали с 1,4 мл десорбирующего буфера (3% лизоцим, 0,1 М NaCl, pH 6,8). Пробирки подвергали биению с помощью шариковой мельницы Retsch MM400, настроенной на 30 Гц в течение 180 с; затем их центрифугировали при 20000 g в течение 180 с. Супернатант использовали для ферментных анализов. Определение проводили в микропланшетах с буфером, используя флуорогенные субстраты на основе 4-метил-умбеллиферила (MUF). Определяли активность ферментов: глюкуронидаза (урони),  $\alpha$ -глюкозидаза (alfaG),  $\beta$ -глюкозидаза (betaG),  $\alpha$ -галактозидаза (alfaGal),  $\beta$ -галактозидаза (betaGal), целлюлаза (клетка), ксилозидаза (ксило), хитиназа (хит), лейцин-аминопептидаза (leu), кислая фосфомоноэстераза (асР), фосфодиэстераза (bisP), пиррофосфат-фосфодиэстераза (ругоР), щелочная фосфомоноэстераза (alkP).

Статистическая обработка проводилась в программе ANOVA ( $P < 0,05$ ). Был проведен детерминированный анализ соответствия (DCA) для обобщения результатов, полученных с микробиологическими параметрами. DCA выполнялись с помощью программного обеспечения PC-ORD (версия 5.10), а корреляции и ANOVA - с помощью программного обеспечения PAST (версия 3.11). Распределение экспериментальных данных было проанализировано с использованием статистического программного обеспечения PAST (версия 3.11).

#### **4 Метод мультисубстратного тестирования**

Адаптирован и впервые применен метод мультисубстратного тестирования дыхательной активности микробных сообществ серой лесной почвы для оценки функционального разнообразия и сукцессии в результате разложения материалов белковой, липидной и полисахаридной природы. В 2017 году был заложен эксперимент по изучению сукцессии микробного сообщества при добавлении в почву бараньего жира, крахмала, растительного масла, шерсти, казеина, желатина, мяса и растительных остатков. В отчетном году продолжено изучение устойчивости дыхательного отклика микробных сообществ на внесение этих субстратов на разных сроках проведения модельного эксперимента. Использование метода мультисубстратного тестирования дыхательной активности микроорганизмов позволило выявить различия в функциональном разнообразии сообществ в ходе их сукцессии в модельном эксперименте. Показано, что дыхательные отклики на карбоновые кислоты были самыми вариабельными, и наиболее яркими оказались отклики на аскорбиновую, янтарную, уксусную и молочную кислоты. Различия откликов дыхательной активности на аминокислоты позволили разделить экспериментальные варианты на 2 группы: высокие отклики наблюдались в безазотистых вариантах (крахмал, растительные остатки, бараний жир, растительное масло) и низкие - в белковых вариантах. Полученные данные о специфике дыхательных откликов микробных сообществ при разложении органических материалов различной природы в системе мультисубстратного тестирования позволяют идентифицировать субстраты, использование которых в мультисубстратном тестировании позволяет реконструировать исходное присутствие белков, жира и крахмала в горшках из погребений.

По данной теме опубликована статья в журнале «*Eurasian Soil Science*» (Q2)/

### **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

Разработан планшетный метод реконструкции исходного присутствия жира в грунте из различных археологических контекстов. Метод основан на количественном определении

активности фермента липазы (специфического вида эстераз), гидролизующей водно-нерастворимые субстраты, такие как триглицериды (жиры), состоящие из длинноцепочечных высших жирных кислот. В качестве субстрата использовали 4-нитрофенил пальмитата (липаза С16).

С помощью данного метода проведено исследование грунта из горшков из погребений различных археологических культур (от эпохи ранней бронзы до Средневековья). Образцы были отобраны при раскопках курганных и грунтовых могильников Братские-1, Братские-3, Гвардейские-3, Адагум-10, Варениковская-2, Волна-1 в 2018-2019 гг. В общей сложности исследовано 42 ритуальных сосуда. В таблице 1 представлены результаты определения липазной и амилазной активности в грунте из сосудов.

Таблица 1. Результаты исследования активности липазы в грунте из горшков аланских погребений

Могильник	Погребение, №	Сосуд	Место отбора	Липаза С4	Липаза С16	Амилаза
				нмоль пНФ/г почвы		
Братские 1-е курганы	1355	Кувшинчик (№ ч 1)	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1355	Кувшинчик (№ ч 2)	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1371	Кружка	верх	33.8±4.9	34.7±6.1	24.4±10.6
			дно	25.0±0.5	0	9.6±0.1
	1373	Кувшинчик (№ ч 1)	верх	27.1±2.9	0	0
			дно	72.3±4.0	0	0
	1373	Миска (№ ч 2)	верх	9.5±1.1	0	0
			дно	8.4±0.8	0	0
	1374	Кувшинчик (№ ч 1)	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1374	Кувшинчик (№ ч 3)	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1378	Кувшинчик	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1383	Кружка (№ ч 2)	верх	21.4±4.3	0	0
			дно	0	0	0
	1383	Кружка (№ ч 3)	верх	0	0	0
			дно	20.0±5.8	0	0
	1389	Кувшинчик	верх	0	49.9±1.7	0
			дно	13.4±1.4	0	0
	1395	Миска (№ ч 2)	верх	0	0	0
			дно	0	0	0
	1401	Кружка	верх	0	22.0±4.9	0
			дно	115.8±1.5	155.4±6.2	0
	1402	Кувшин (№ ч 4)	верх	0	0	0
			дно	0	13.4±6.2	0
1412	Кружка	верх	0	0	0	
		дно	20.6±0.3	0	0	
1413	Кувшин	верх	0	0	0	
		дно	90.9±2.9	15.4±8.4	0	
1414	Кувшин	верх	0	0	0	
		дно	0	0	0	
1425	Кружка	верх	0	0	0	
		дно	19.6±0.1	0	0	
1432	Кружка	верх	0	0	0	
		дно	29.5±1.9	16.4±3.4	14.4±7.4	
1443	Кувшин	верх	0	0	0	
		дно	44.6±9.4	0	0	
1452	Кувшин (№ ч 1)	верх	7.7±1.1	76.0±2.7	0	
		дно	0	29.2±0.9	0	

1452	Кувшин (№ ч 25)	верх	0	17.1±1.5	0
		дно	0	29.1±2.2	0
1452	Миска (№ ч 27)	верх	44.3±4.7	41.1±0.6	0
		дно	42.8±10.2	63.6±2.0	0
1452	Кружка (№ ч 28)	верх	0	11.7±2.5	0
		дно	13.9±4.4	50.3±6.4	0
1456	Кружка	верх	0	0	0
		дно	0	0	0
1457	Горшок	верх	0	0	0
		дно	37.6±0.3	0	0
1458	Кружка	верх	16.7±2.1	0	0
		дно	36.2±1.4	14.1±4.2	0
1469	Кувшин (№ ч 2)	верх	0	0	0
		дно	0	0	0
1469	Кувшин (№ ч 5)	верх	0	0	0
		дно	0	0	0
1474	Кружка	верх	90.9±6.2	49.1±1.2	36.8±0.7
		дно	0	0	0
Курган 12. погр. 1	Двуруч. кувшин	верх	0	0	0
		дно	0	0	25.8±2.1
Курган 60 №1	Кувшин	верх	0	0	0
		дно	0	0	0
Курган 60 №2	Кружка	верх	0	0	0
		дно	20.1±2.5	0	0
Братские 3-е курганы	Курган 61	Кувшинчик	верх	0	0
			дно	0	0
Гвардейские 3-е курганы	Погр. 7	Кувшин	верх	0	0
			дно	0	0
			дно	0	0

Установлено, что из 32 сосудов аланской культуры высокая активность липазы была выявлена в грунте из 12. Практически во всех случаях высокая активность фермента была выявлена в нижней части заполнения сосуда. По типу сосудов это, преимущественно, кружки. Кроме того, высокая активность фермента липазы была выявлена в грунте из нескольких кувшинов и одной миски. В настоящее время ведутся работы по изучению липазной активности грунта из сосудов из могильников Братские и Гвардейские в РСО-Алания и Республике Чечня. Из этих раскопок в текущем году был получен большой массив образцов грунта из сосудов из погребений аланской культуры (более 50 образцов). После завершения анализа общая выборка превысит 100 сосудов, что позволит детально и статистически достоверно охарактеризовать встречаемость жиров в погребальном обряде аланской культуры и получить общие представления об этой детали погребального обряда для ряда культур эпохи бронзы.

Разработанный метод может использоваться при установлении присутствия жира в качестве ритуальной пищи в погребениях различных археологических культур.

На основании полученных данных будет подготовлена к публикации статья в журнал *«Краткие сообщения Института археологии РАН»*

Для выявления исходного присутствия изделий из шерсти в погребальном обряде различных археологических культур исследован крупный массив образцов грунта из погребений эпохи бронзы и раннего железного века. Для реконструкции использования шерстяных изделий использован разработанный нами аппликационный метод определения кератинолитических грибов в почвах. Метод основан на количественном учете колоний кератинолитических грибов, вырастающих при посеве почвенной суспензии на специальном образом подготовленный кератин-содержащий субстрат. Для

почвенных грибов такого типа предложен и введен в научный оборот термин «WD-fungi» - грибы, разрушающие шерсть. Метод опробован на подскелетных образцах грунта из семи погребений эпохи бронзы и семи античных погребений. Во всех случаях образцы грунта отбирались под черепом, под грудным отделом позвоночника, под тазом, под коленями и под ступнями.

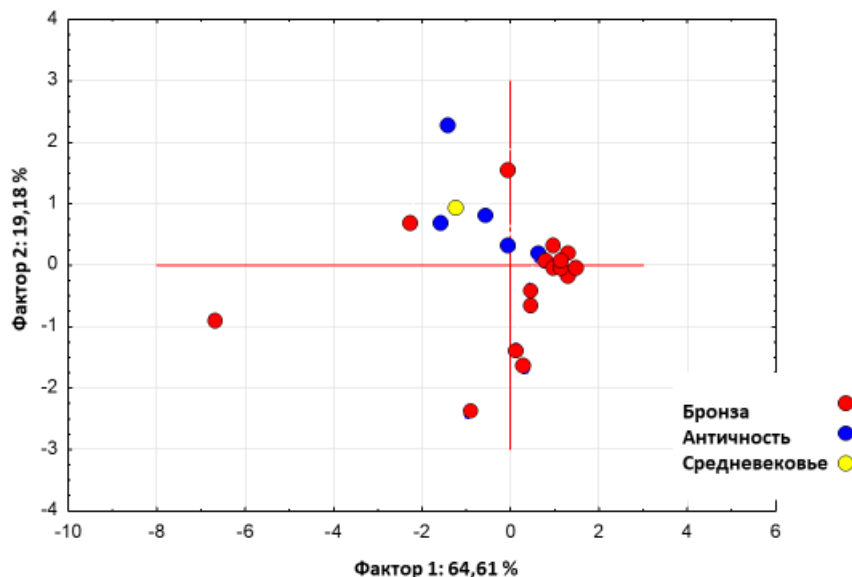


Рис. 1 Анализ погребальных грунтов с помощью метода главных компонент Курганные могильники Бейсужек, Адагум, Гвардейские, Волна, Братские. Проекция наблюдений на факторную плоскость (1 × 2). Группирующая переменная – эпоха

Установлено, что во всех погребениях величины численности КОЕ WD-грибов были выше, чем в контрольных образцах верхнего слоя погребенных под курганами почв. В каждом погребении были найдены локусы с повышенной численностью КОЕ WD-грибов, что указывает на факт исходного присутствия изделий из шерсти. В погребениях эпохи бронзы увеличение данного показателя выявлялось в грунтах под ступнями, тогда как античные погребения, наоборот, характеризовались низкими значениями численности КОЕ в грунтах под ступнями и высокими ее значениями – в грунтах под позвоночником. Эти различия могут быть связаны с особенностями погребального обряда в эпоху бронзы и античное время.

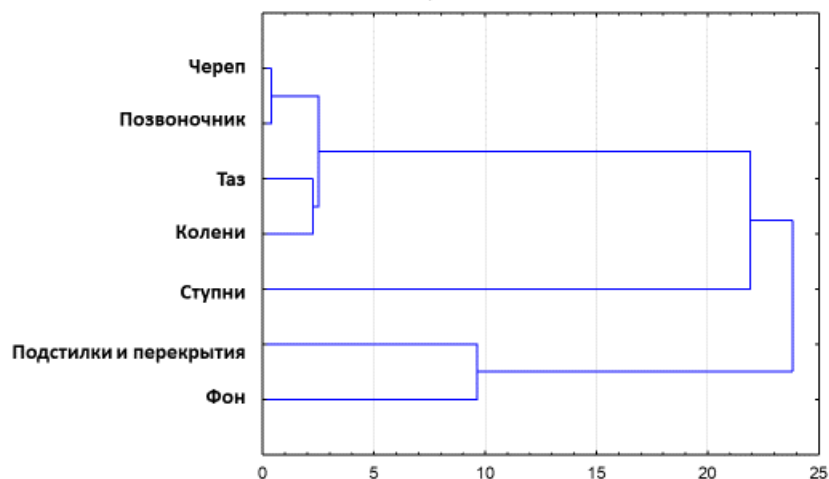


Рис. 2. Результаты кластерного анализа погребальных грунтов. Курганные могильники: Бейсужек, Адагум, Гвардейские, Песчаный, Темрта, Волна, Братские

Разработанный метод имеет высокий потенциал для использования при реконструкции одежды погребенных в разных археологических культурах.

По материалам данного исследования подана в печать статья в журнал «*Journal of Archaeological Science*»

Впервые поставлен вопрос о древнем антропогенной микробиологическом загрязнении почв. Проведено исследование почв в окрестностях поселения аланской культуры V-VIII вв. н.э. в окрестностях г. Кисловодска. Ранее было установлено, что вокруг поселений такого типа располагались поля, в почвы которых, предположительно, вносили навоз. После этого с раннего средневековья до настоящего времени на территории исследуемого ключевого участка не осуществлялась интенсивная хозяйственная деятельность, способная вызвать заметные изменения почвенных свойств. Для сравнения были исследованы почвы в пределах производственной зоны современного сельского домовладения, включающей огородные удобряемые почвы. Для исследования химических и микробиологических свойств почв в том и в другом случае была заложена серия почвенных разрезов на разном удалении от поселения: в зоне регулярного внесения удобрений, в зоне эпизодического внесения удобрений и на целинных участках. В отобранных образцах почв определяли численность термофильных бактерий, которые могли поступать в почву только при длительном и систематическом внесении навоза, компостов и других, нагревающихся при созревании, органических удобрений. Установлено, что вокруг современного сельского домовладения в почвах, в которые регулярно вносится навоз, численность термофильных микроорганизмов значительно превышает фоновый уровень. По мере удаления от домовладения численность термофильных микроорганизмов снижается. Такая же закономерность в изменении численности термофильных микроорганизмов была выявлена в почвах в окрестностях древних поселений.



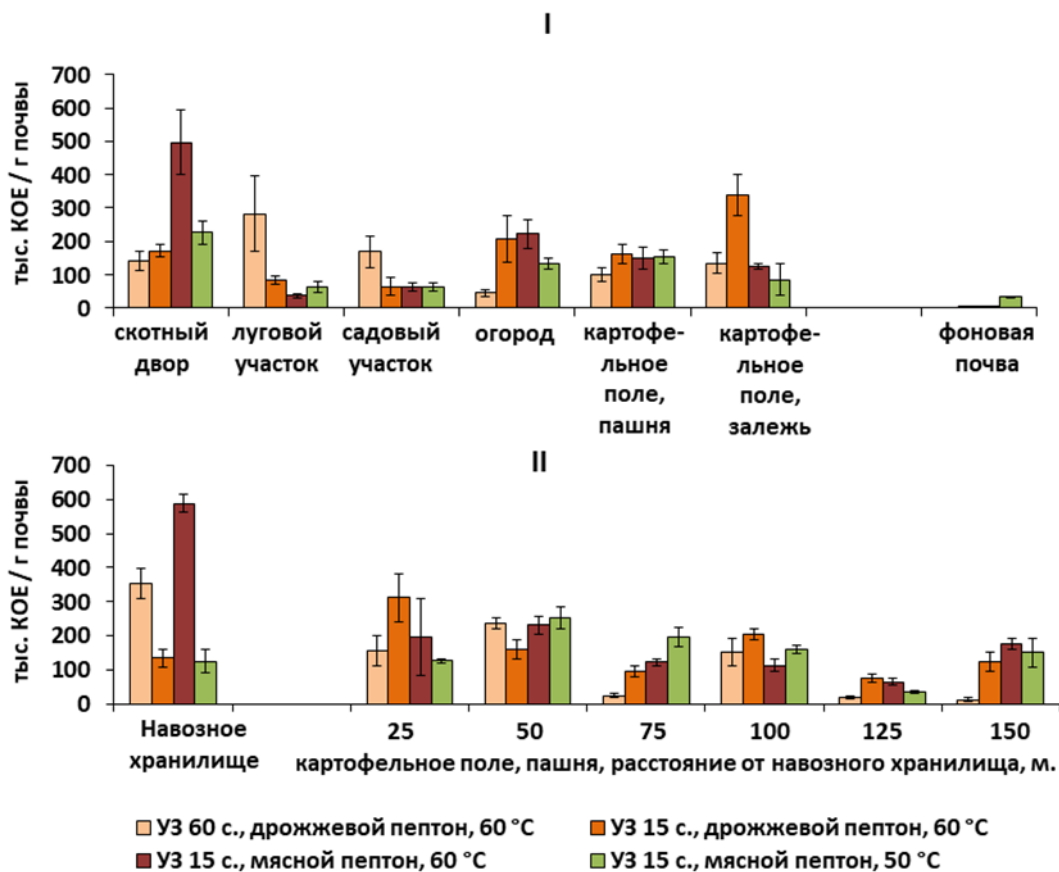


Рис. 3. Численность термофильных бактерий в верхнем слое почв на различных участках традиционного сельского домовладения

Так, в почве, ближайшей к поселению, численность термофильных микроорганизмов составляла 147 тыс. клеток/г в то время как в фоновой почве этот показатель не превышал 0.01 тыс. клеток/г. Исходя из этого, мы можем заключить, что за период 1500 лет не произошло самоочищение почв, и в них сохранились жизнеспособные формы термофильных микроорганизмов. Высокая их численность указывает на длительность и масштабы применения навоза в земледельческой практике в аланское время.

Полученные данные могут использоваться для выявления и установления границ древних удобряемых земледельческих угодий.

По материалам данного исследования опубликована статья в материалах конференции: *19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019*. (индексируются базой данных Scopus)

Разработан комплексный подход для выявления мест содержания скота на поселениях по изменению микробиологических почвенных свойств. При разработке данного подхода мы исходили из положения, что отличием мест содержания скота от других объектов инфраструктуры поселений является поступление в почву продуктов жизнедеятельности животных в объемах, значительно превышающих их поступление в культурный слой жилой зоны. Этот факт будет значительно изменять параметры микробного сообщества почв, вызывая бурный рост численности микроорганизмов,

участвующих в разложении продуктов жизнедеятельности животных. В свою очередь, эти группы микроорганизмов будут продуцировать ферменты, непосредственно участвующие в разложении органических субстратов, входящих в состав экскрементов животных.

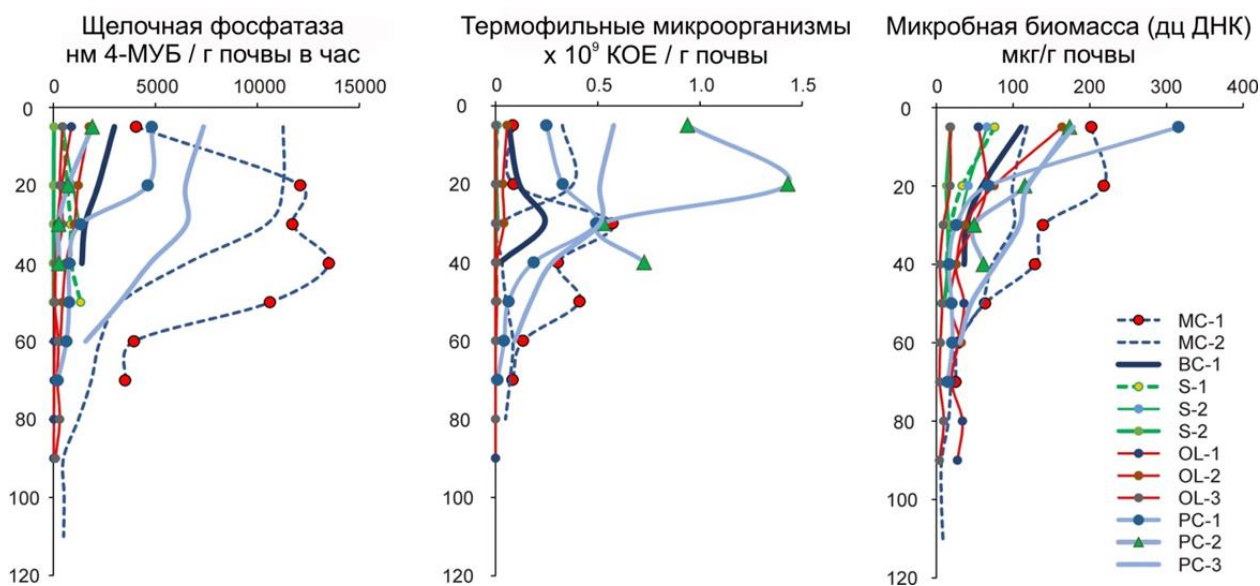


Рис. 4. Результаты анализа почв современных и древних загонов. MC – средневековые загоны; S – современные фоновые почвы; OL – культурные слои поселений; PC – современные загоны

Таким образом, структура микробного сообщества почв и активность отдельных ферментов, связанных с разложением навоза, могут быть индикаторами мест содержания скота. Анализ почв современных и древних загонов для скота на территории Кисловодской котловины позволил установить, что диагностическими признаками мест содержания скота будет увеличение общей микробной биомассы и численности термофильных микроорганизмов. Но, наиболее информативным показателем является ферментативная активность, в первую очередь активность щелочной фосфатазы и бисфосфатазы.

Кроме того, показана возможность отличить почвы загонов от культурного слоя. Так, в обоих случаях может наблюдаться значительное увеличение содержания фосфатов и общей микробной биомассы, однако ферментативная активность и численность термофильных микроорганизмов всегда будет выше в почвах загонов.

Полученные результаты имеют потенциал использования для поиска мест содержания скота на поселениях где нет каменной архитектуры и контуры загонов для скота не видны с поверхности.

По материалам данного исследования подана в печать статья в журнал *«Journal of Archaeological Science: Reports»*.

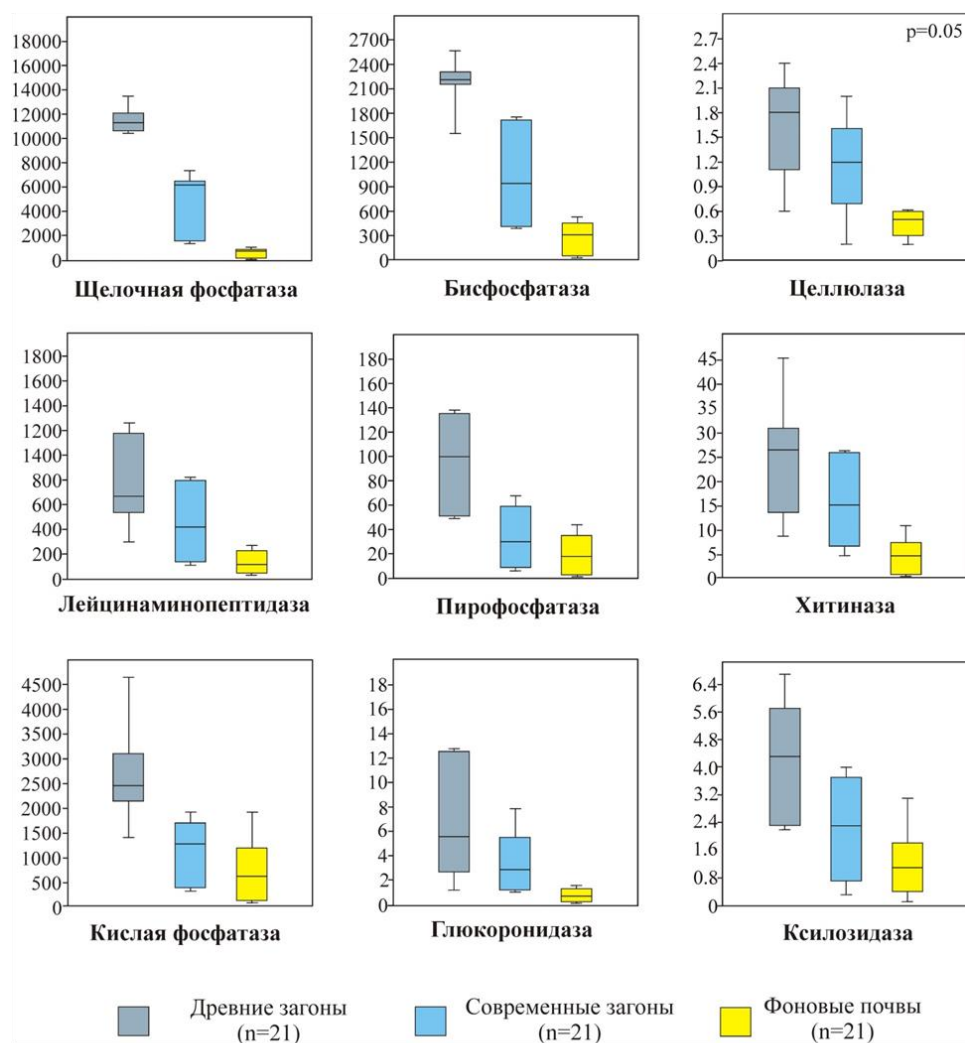


Рис. 5. Ферментативная активность почв древних и современных загонов для скота в горной зоне и культурных слоев поселений

Кроме того, показана возможность отличить почвы загонов от культурного слоя. Так, в обоих случаях может наблюдаться значительное увеличение содержания фосфатов и общей микробной биомассы, однако ферментативная активность и численность термофильных микроорганизмов всегда будет выше в почвах загонов.

Полученные результаты имеют потенциал использования для поиска мест содержания скота на поселениях, где нет каменной архитектуры и контуры загонов для скота не видны с поверхности.

По материалам данного исследования подана в печать статья в журнал *«Journal of Archaeological Science: Reports»*.

С помощью совместного использования методов геофизики, почвоведения и почвенной микробиологии удалось установить инфраструктуру одного из крупнейших финно-угорских городищ Предуралья – городище Гурьякар (IX-XIII вв. н.э.). На этом памятнике был апробирован алгоритм изучения средневековых поселений, разрушенных распашкой. Алгоритм предполагает последовательное применение ряда взаимно подтверждающих не деструктивных методов исследований: аэрофотосъёмки беспилотными летательными аппаратами, электропрофилеирования, магниторазведки,

электротомографии и методов из арсенала почвенной микробиологии. Для выявления границ зон разноплановой застройки поселения была выполнена статистическая обработка данных о химических свойствах (рН, уреазная активность, содержание фосфатов) и магнитной восприимчивости образцов культурного слоя в разных точках поселения по линейной трансекте длиной 132 м. Полученные данные были сопоставлены с результатами геофизической съемки. Предварительный анализ выполнен методом главных компонент. На заключительном этапе применяются специализированные математические методы: вейвлет-преобразования данных многозональной аэрофотосъёмки и статистическая обработка (метод главных компонент и классификация алгоритмом k-means) химических свойств почвенных материалов. Благодаря комплексному подходу удалось выявить зоны жилой и производственной застройки. Такой подход дополняет сравнительный анализ разноплановых данных и существенно повышает достоверность исторической реконструкции. Междисциплинарные исследования, проведённые на средневековом финно-угорском городище Гурьякар, позволили получить принципиально новую информацию для исторических реконструкций: выявить не известную ранее линию эшелонированной системы укреплений, и показать факт наличия хозяйственной скотоводческой зоны между двумя линиями обороны.

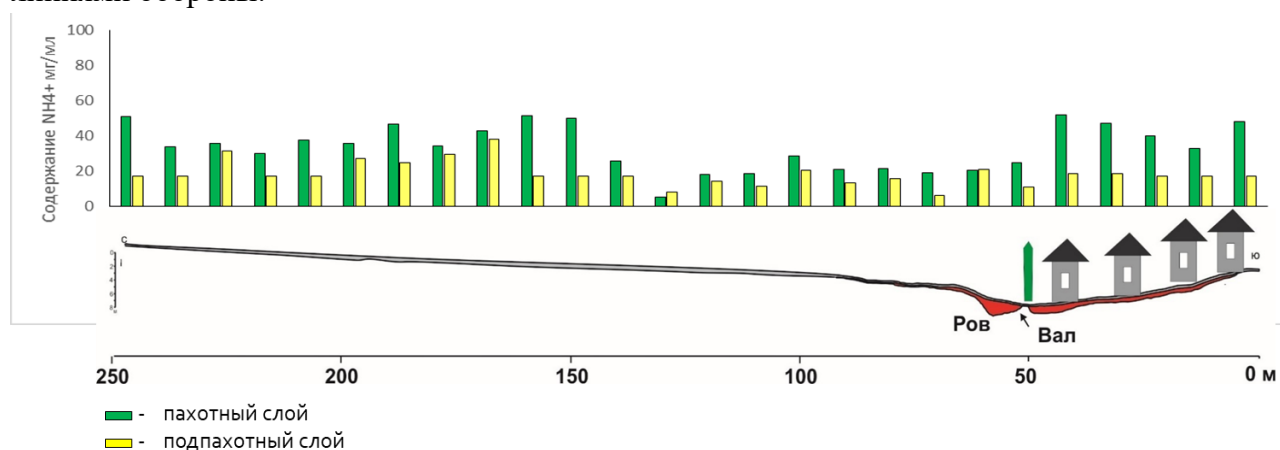


Рис. 6. Уреазная активность почв на территории поселения Гурьякар и на прилегающей к памятнику территории.

Использование методов почвенной микробиологии и энзимологии, наряду с традиционными не деструктивными методами исследований, может использоваться при реконструкции инфраструктуры поселений и выявления зон жилой и производственной застройки.

По результатам этого исследования принята в печать статья в журнал *«Archaeological Prospection»*

Одной из важнейших и нерешенных задач в области реконструкции исходного присутствия шерсти долгое время оставалась проблема «кератинового следа» от кожи при реконструкции исходного присутствия изделий из шерсти в погребениях. Это связано с тем, что в коже также присутствует кератин, хотя и в значительно меньших количествах, по сравнению с шерстью. Найти подходы к решению данной проблемы удалось только в отчётном году. Для этого были выполнены расчеты общей численности клеток

микроорганизмов на почвенном агаре (ПА) (рассматривается в качестве фона), общей численности микроорганизмов на богатой среде (БС) (рассматривается как имитация белковой среды (кожа)) и численность кератинолитических грибов (КГ) разлагающих шерсть. Наблюдения проводились на 55 образцах тленов из 4 курганов (14 погребений) курганного могильника Бейсужек-35. При анализе проекции этих переменных в факторной системе координат группа грибов, усваивающих шерсть (КГ), образовала отдельный вектор. В качестве контроля взят смешанный образец верхних горизонтов подкурганной палеопочвы. Анализ тленов погребальных подстилок показал достаточно частые случаи высокой численности клеток на БС для образцов, отобранных вблизи костяка и высокое значение данного показателя в одном из образцов с охрой, для которого также была показана высокая липазная активность. При этом в тленах, расположенных на некотором удалении от костяка, и особенно в тленах за головой высокая численность клеток кератинолитических грибов не сопровождалась высокой общей численностью КОЕ на БС, что подтверждает исходное присутствие именно шерсти в этих образцах. Тлен на уровне палеопочвы практически не отличался от контроля. Таким образом нам удалось разделить по этим показателям образцы из чистого шерстяного субстрата от смешанных образцов, где присутствовали и кератин шерсти и белки кожи.

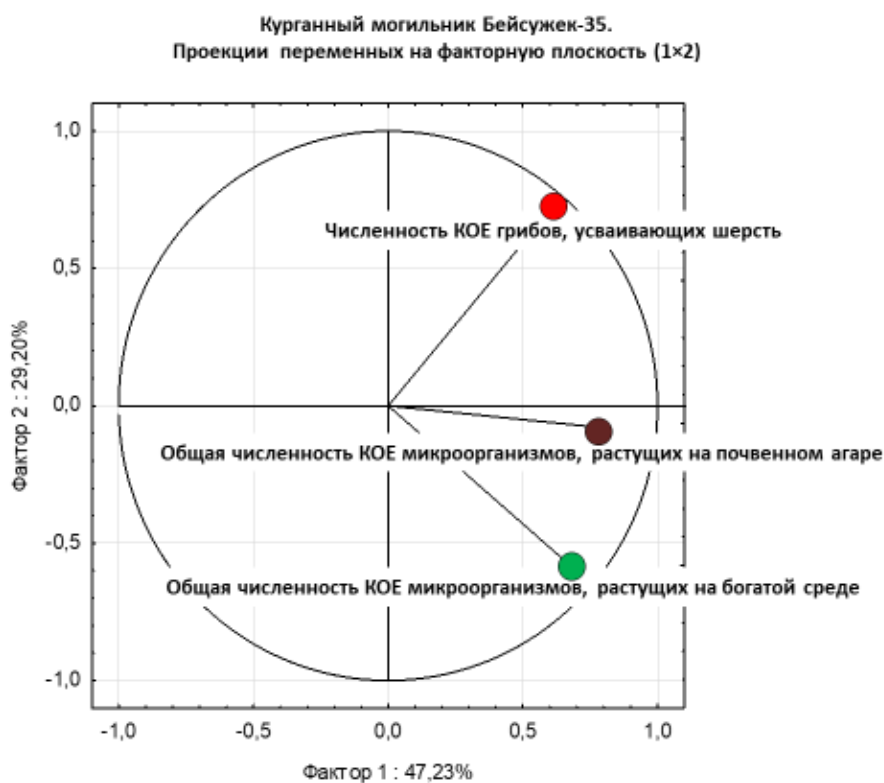


Рис. 7 Статистическая обработка результатов разделения кератинолитических грибов на разных средах

Подобраны оптимальные лабораторные условия для роста термофильных микроорганизмов из различных археологических контекстов. Этот показатель является одним из важнейших при выявлении присутствия стойлового навоза. Установлено, что общая численность термофильных микроорганизмов была достоверно более высокой после применения при обработке ультразвуком в течение 15 с. в I разведении, по

сравнению с более длительной обработкой – 1 мин. – во II разведении. Численность термофильных актиномицетов была достоверно более высокой при обработке ультразвуком в течение 15 с. в I разведении – по сравнению с более длительной обработкой во II разведении. Поэтому, в качестве оптимального режима обработки ультразвуком рекомендован режим 15 с. в суспензии I разведения. Наибольшая численность колоний термофильных микроорганизмов наблюдается при использовании мясного пептона в составе глюкозо-пептонно-дрожжевой среды. Показан более активный рост термофильных микроорганизмов при 50°C по сравнению с 60°C.

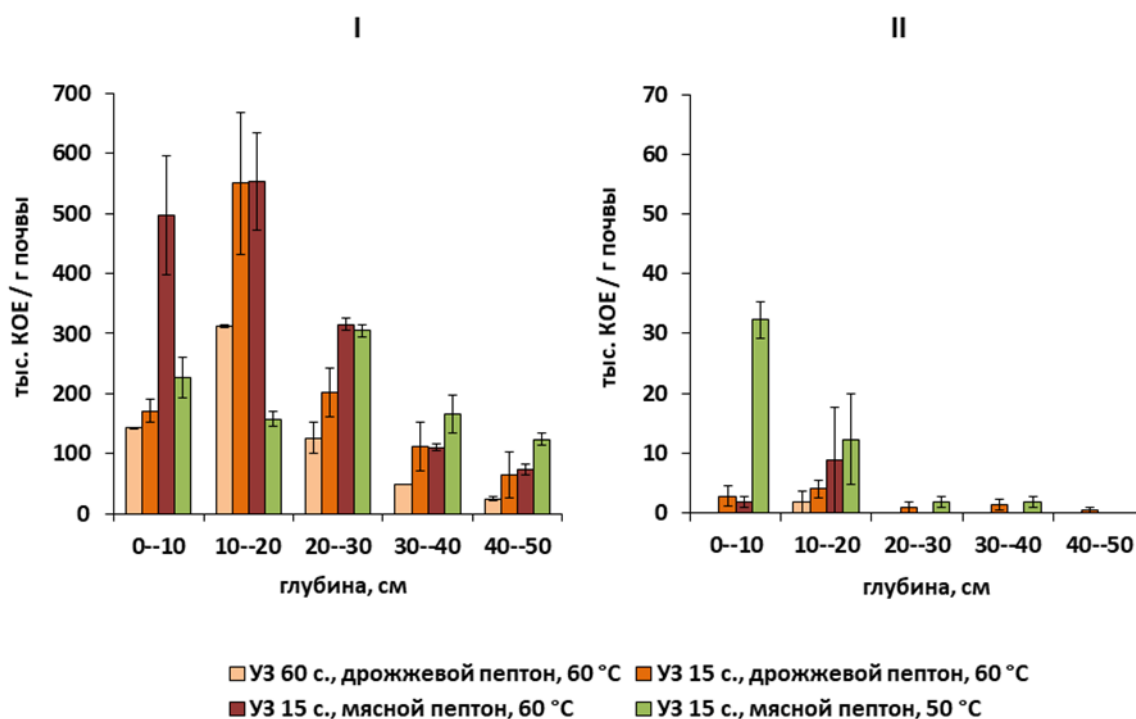


Рис. 8. Численность термофильных бактерий в профиле почвы скотного двора (I) и современной фоновой почвы (II)

Подготовлена к печати коллективная монография. Получены благоприятные отзывы научных рецензентов. Сдача книги в печать отложена до конца года, в связи с тем, что в 2019 году был получен большой массив образцов грунта из сосудов из погребений аланской культуры (более 50 образцов) и более 60 образцов тленов со дна погребений Братских-1, Братских-3 и Гвардейских курганных могильников в Республике Чечня. Образцы поступили в лабораторию только в сентябре месяце после завершения раскопок могильников и в настоящее время активно изучаются. На образцах погребальных грунтов из этих могильников в 2028 году была впервые показана липазная активность в грунте из горшков, что позволяет сделать вывод о присутствии жира в сосудах. Включать в книгу только данные 2018 года без данных 2019 представляется неправильным. Поэтому было принято решение не сдавать монографию в печать, до завершения блока работ по изучению липазной активности грунта из горшков. Средства на издание книги зарезервированы.

## НОВИЗНА И АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные в рамках выполнения данного проекта результаты имеют абсолютный приоритет среди отечественных и зарубежных исследований. Следует отметить, что методы микробиологического анализа почв из различных источников только начинают применять на практике, хотя молекулярно-генетические исследования развиваются довольно активно (Molecular archaeology, 2008). Но эти методы довольно дорогостоящие и пока не находят широкого применения в практике археологических исследований.

Несмотря на то, что живые микроорганизмы в различных археологических контекстах были показаны более 40 лет назад (Seaward et al., 1976), потенциал этого источника археологической информации еще практически не реализован. Пожалуй, наиболее значимым событием в этом направлении и первым наиболее близким к нашим работам исследованием стала публикация P. Southern в Science, где были показаны результаты микробиологического изучения почвы с поверхности археологических керамических сосудов (Southern, 2008). Но на тот момент это было лишь единичное явление, еще не инкорпорированное в некую общую идею. Лишь в 2010 году появилась в относительно полно сформулированном виде концепция микроархеологии или за пределами видимого “microarchaeology: beyond the visible archaeological record” (Weiner, 2010). Это направление представляется частью более широкого тренда на «интегративную» археологию, предполагающего широкое внедрение в археологическую науку методов из арсенала естественных наук (Wiener, 2008).

На сегодняшний день ситуация в области использования методов микробиологии в археологических исследованиях наиболее детально описана в статье R. Margesin с соавторами «Microbiology Meets Archaeology (Margesin et al., 2017). В этой публикации авторы ссылаются на наши работы, указывая, что впервые возможность сохранения в микробном сообществе почвы информации об антропогенном воздействии показана в работах (Demkin et al., 2004; Chernysheva et al., 2015; Peters et al., 2015). Во многом, опираясь на наши пионерские исследования B.S. Grund с соавторами начали исследовать антропогенно-измененные почвы и седименты (Grund et al., 2014).

В последние годы начинается активное привлечение методов почвенной микробиологии к решению вопросов, связанных с выявлением микробных заболеваний человека и изменений в археологических артефактах вследствие биохимических реакций (Mulec et al., 2015), поиску микробиологических следов патогенов древнего человека (Reitz, Shackley, 2012) и ископаемых животных (Gill et al., 2008). Следует также упомянуть серию работ по использованию копрофильных микроорганизмов при палеоэкологических реконструкциях и при выявлении следов доместикировки животных (van Geel et al., 2003, 2011).

Но все приведенные выше исследования представляют собой лишь отдельные работы, не объединенные в общее направление, терминологически и понятийно обоснованное, с четким предметом исследований, диверсифицированной и адаптированной методической базой и актуальным кругом решаемых задач

В этом отношении, безусловно, выделяется круг публикаций, выполняемых в рамках данного проекта. Впервые все выполняемые в рамках данного проекта работы объединены общим направлением, названным нами археологической микробиологией. Предметом исследований, как было указано выше, являются особенности использования

различных органических материалов в бытовой, производственной и ритуальной сфере древнего человека. В соответствии с этим, и круг решаемых проблем включает целый спектр областей исследований, в каждой из которых коллектив исполнителей проекта достиг заметных результатов.

Так, в частности, в области использования методов почвенной микробиологии в выявлении кератин-содержащих субстратов и реконструкции исходного присутствия изделий из шерсти наши работы имеют абсолютный приоритет. Так, если факт накопления почвенных кератинофильных грибов из шерсти, шкур и перьев в местах содержания домашних животных, хозяйственных ямах или кладовых был показан ранее (Marfenina et al., 2008; Siles et al., 2018), то погребальные грунты из древних захоронений с этой точки зрения пока не рассматривались и в этой области наши исследования имеют абсолютный приоритет.

Также пионерским подходом можно назвать использование методов почвенной энзимологии в изучении археологических материалов. До начала наших исследований в этой области были известны лишь две работы, в которых была показана возможность длительного (в археологических масштабах времени) сохранения высокой фосфатазной и амидазной активности в антропогенно-преобразованных почвах удобряемых полей (Dick et al, 1994; Frankenberger, Dick, 1983). В наших исследованиях раскрытие «ферментативной памяти» почв и культурных слоев археологических памятников является одним из основных методических подходов.

В рамках данного проекта впервые разработан комплексный подход к выявлению древних земледельческих угодий с использованием методов почвенной микробиологии и энзимологии. До этого использовались лишь физико-химические свойства (Holliday, Gartner, 2008; Homburg, Sandor, 2011; Wilkinson, Stevens, 2008 Lisetskii et al., 2015). Однако, физико-химические свойства культурного слоя и почвы в загонках для скота довольно близки, и встречаемость артефактов в том и в другом случае может быть одинаковой. Поэтому только использование микробиологических методов позволило там достоверно и однозначно диагностировать факт содержания скота и накопление стойлового навоза.

Нами впервые выполнен комплексный анализ инфраструктуры с использованием методов почвенной микробиологии (Гак и др., 2014).

В целом можно заключить, что методы из арсенала почвенной микробиологии и энзимологии, такие как определение ферментативной активности, структуры и численности почвенного микробного сообщества ранее не применялись в изучении археологических памятников и авторский коллектив имеет абсолютный приоритет в данной области.

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПРОЕКТА**

Борисов А. В., Чернышева Е. В. Следы древнего микробиологического загрязнения в современных почвах // История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований: Сб. науч. тр. по материалам науч. конф., посвящ. 100-летию кафедры физиологии растений и микроорганизмов Перм. гос. нац. исслед. ун-та / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2017. С. 124-128.



Зинчук С. В. Химические и микробиологические свойства почв древних загонов для скота в субальпийской зоне (Северный Кавказ) // История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований: Сб. науч. тр. по материалам науч. конф., посвящ. 100-летию кафедры физиологии растений и микроорганизмов Перм. гос. нац. исслед. ун-та / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2017. С. 130-133.

Борисов А.В., Демкина Т.С., Каширская Н.Н., Плеханова Л.С., Хомутова Т.С., Чернышева Е.В. Биологическая память почв о древнем антропогенном воздействии // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и на сопредельных территориях: Материалы VII Междунар. науч. конф. (памяти проф. Петина А.Н.). Белгород: Изд-во «ПОЛИТЕРРА», 2017. С. 116-119.

Плеханова Л.Н. Уникальные эталоны почв для создания региональной Красной книги почв Южного Урала // Современное ландшафтно-экологическое состояние и проблемы оптимизации природной среды регионов: матер. XIII Международной ландшафтной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ф.Н. Милькова. Воронеж, Истоки, 2018. - Т.2. С. 347-348.

Plekhanova L.N. Cellulase activity in anthropogenically disturbed chernozems // 18th International Multidisciplinary Scientific Geoconference- SGEM; Conference proceedings. Volume 18/ Issue 5.2. Bulgaria, 2018. P. 173-179. DOI:10.5593/sgem2018/5.2

Потапова А.В., Пинской В.Н., Гак Е.И., Каширская Н.Н., Борисов А.В. Пространственное варьирование химических и микробиологических свойств культурного слоя (по данным поселения эпохи бронзы в лесостепном Подонье) // Археология, этнография и антропология Евразии. 2018. (в печати)

Каширская Н.Н., Потапова А.В., Клещенко А.А., Борисов А.В. Микробиологическое выявление присутствия субстратов животного происхождения в погребальных подстилках эпохи бронзы // Краткие сообщения Института Археологии/ 2018 (в печати)

Хомутова Т.Э., Дущанова К.С., Смирнов В.Э., Борисов А.В. Сукцессия микробного сообщества серой лесной почвы при разложении органических материалов различного состава. Почвоведение, 2018. (в печати)

Борисов А.В., Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Каширская Н.Н., Чернышева Е.В. Плеханова Л.Н. Дущанова К.С. Археологическая микробиология: теория и практика обнаружения органических материалов в археологических исследованиях // Материалы II Международную научную конференцию «Современные решения актуальных проблем евразийской археологии». Барнаул, 4-8 сентября, 2018

Борисов А.В., Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., О возможности реконструкции зимних и летних осадков в разные исторические периоды // «XXI Уральское археологическое совещание» посвященное 85-летию со дня рождения Г.И. Матвеевой и 70-летию со дня рождения И.Б. Васильева. Самара, 8-12 октября 2018 г.

Борисов А.В., Федотов А.Э. Особенности химических и микробиологических свойств культурного слоя городища Болгар в зависимости от характера использования территории // Материалы VIII международной научной конференции «Диалог городской и степной культур на евразийском пространстве», посвященной памяти Г. А. Фёдорова-Давыдова. Ставропольский край, г. Пятигорск, с. Прасковья. 20-25 сентября 2018 г.

Петросян А.А., Сыроватко С.А., Плеханова Л.Н., Мякшина Т.Н., Потапова А.В., Каширская Н.Н. Установление наличия шерстяных субстратов в погребении по численности кератинолитических микроорганизмов // Материалы II Международной

научной конференции «Современные решения актуальных проблем Евразийской археологии». Барнаул, 2018.

Каширская Н.Н., Петросян А.А., Плеханова Л.Н., Сыроватко А.С., Мякшина Т.Н., Потапова А.В. Кремированные средневековые захоронения и попытки идентификации присутствия шерстяных субстратов // Материалы VIII международной научной конференции «Диалог городской и степной культур на евразийском пространстве», посвящённой памяти Г. А. Фёдорова-Давыдова. Ставропольский край, Пятигорск. 2018 (в печати)

Каширская Н.Н., Потапова А.В., Клещенко А.А., Борисов А.В. Микробиологическое выявление субстратов животного происхождения в погребальных подстилках эпохи бронзы // Краткие сообщения Института археологии. 2018. № 253. С. 403-416.

Khomutova T.E., Dushchanova, K.S., Smirnov, V.E., Borisov, A.V. Succession of Microbial Community in Gray Forest Soil during the Decomposition of Different Organic Compounds // Eurasian Soil Science. 2019. Volume 52. Issue 8. pp 963–970. DOI:10.1134%2FS1064229319080088

Kashirskaya N., Chernysheva E., Plekhanova L., Borisov A. Thermophilic microorganisms as an indicator of soil microbiological contamination in antiquity and at the present time // 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. Conference Proceedings. Volume: 19. 569-574.

Каширская Н.Н., Плеханова Л.Н., Петросян А.А., Потапова А.В., Сыроватко А.С., Клещенко А.А., Борисов А.В. Подходы к выявлению изделий из шерсти по численности кератинолитических микроорганизмов в грунтах древних и средневековых погребений // Нижневолжский археологический вестник. 2018. Т. 17. № 2. С. 95-107.

Kashirskaya N., Borisov A. A keratin-baiting method for identification of wool in ancient burials // Archaeological Science. (in press)

Потапова А.В., Пинской В.Н., Гак Е.И., Каширская Н.Н., Борисов А.В. Пространственное варьирование химических и микробиологических свойств культурного слоя (по данным поселения эпохи бронзы в лесостепном Подонье). Российская археология. 2020. (в печати).

Chernysheva E., Korobov D., Kashirskaya N., Khomutova T., Fornasier F., Borisov A. Soil microbiological properties in corrals at archaeological sites: a new approach to find livestock keeping locations // Archaeological Science: Reports. (in press)

## Литература

- Chernysheva EV, Korobov DS, Khomutova TE, Borisov AV (2015) Urease activity in cultural layers at archaeological sites. *J Archaeol Sci: Reports* 57:24–31. doi: 10.1016/j.jas.2015.01.022
- Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S. Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru // *Agric Ecosyst Environ.* 1994. V. 50. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90131-7)
- Frankenberger W.T., Dick W.A. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil // *Soil Sci Soc Am J.* 1983. V. 47. P. 945–951. doi:10.2136/sssaj1983.03615995004700050021x
- Gill J.L., Williams J.W., Jackson S.T., Lininger K.B., Robinson G.S. Pleistocene megafaunal collapse, novel plant communities, and enhanced fire regimes in North America // *Science*, 326. 2009, pp. 1100–1110. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-70450177178&origin=inward&txGid=fd09169385ac2629d2915156a9a40e8c>
- Grund B.S., Williams S.E., Surowell T.A. Viable paleosol microorganisms, paleoclimatic reconstruction, and relative dating in archaeology: a test case from Hell Gap, Wyoming // *Journal of Archaeological Science.* 2014. 46. 217–228. doi: 10.1016/j.jas.2014.02.010
- Holliday V.T., Gartner W.G. Methods of soil P analysis in archeology // *J Archaeol Sci.* 2007. V. 34. P. 301–333. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.05.004>
- Homburg J.A., Sandor J.A. Anthropogenic effects on soil quality of ancient agricultural systems of the American Southwest // *Catena.* 2011. V. 852. P. 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2010.08.005>
- Ivanova A., Marfenina O. Soil fungal communities as bioindicators of ancient human impacts in medieval settlements in different geographic regions of Russia and southwestern Kazakhstan // *Quaternary International/ Volume 365*, 16 April 2015, Pages 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2014.10.016>
- Knipper, C., Reinhold, S., Gresky, J., Belinskiy, A., Alt, K.W. Economic strategies at bronze age and early iron age Upland sites in the North Caucasus: Archaeological and stable isotope investigations // *Isotopic Investigations of Pastoralism in Prehistory.* Pages 123–140. DOI: 10.4324/9781315143026
- Krupskia M., Kabalab C., Sadyk A., Gliński R., Wojcieszak J. Double- and triple-depth digging and Anthrosol formation in a medieval and modern-era city (Wrocław, SW Poland). Geoarchaeological research on past horticultural practices // *Catena.* Volume 153, June 2017, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.01.028>
- Lisetskii, F.N., Stolba, V.F., and Marinina, O., Indicators of agricultural soil genesis under varying conditions of land use, Steppe Crimea, *Geoderma*, 2015, vols. 239–240, pp. 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.11.006>
- Marfenina O.E., Ivanova A.E., Kislova E.E., Zazovskaya E.P., Chernov I. Y. Fungal Communities in the Soils of Early Medieval Settlements in the Taiga Zone // *Eurasian Soil Sci.* 2008. V. 41. P. 749–759. DOI: 10.1134/S1064229308070090
- Margesin R, Siles J., Cajthaml T., Öhlinger B, Kistler E. Microbiology Meets Archaeology: Soil Microbial Communities Reveal Different Human Activities at Archaic Monte Iato (Sixth Century BC) Microbial Ecology, May 2017, Volume 73, Issue 4, pp 925–938. (doi: 10.1007/s00248-016-0904-8)

Mulec J, Krištufek V, Chroňáková A, Oarga A, Scharfen J, Šestauberová M Microbiology of healing mud (Fango) from Roman thermae Aquae Iasae archaeological site (Varaždinske Toplice, Croatia). *Microbial Ecology*. 2015. 69. 293–306. doi: 10.1007/s00248-014-0491-5

Peters S, Borisov AV, Reinhold S, Korobov DS, Thiemeyer H (2014) Microbial characteristics of soils depending on the human impact on archaeological sites in the northern Caucasus. *Quat Int* 324:162–171. doi: 10.1016/j.quaint.2013.11.020

Reed D. Molecular archaeology // *Encyclopedia of Archaeology*. 2008. 1648-1655. <https://doi.org/10.1016/B978-012373962-9.00197-7>

Reitz E.J., Shackley M. *Environmental Archaeology*. Springer, New York (2012). [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Environmental%20Archaeology&publication\\_year=2012&author=E.J.%20Reitz&author=M.%20Shackley](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Environmental%20Archaeology&publication_year=2012&author=E.J.%20Reitz&author=M.%20Shackley)

Seaward M., Cross T., Unsworth B. Viable bacterial spores recovered from an archaeological excavation // *Nature*, 261. 1976. pp. 407-408. DOI: 10.1038/261407a0

Siles J., Öhlinger B., Cajthaml T., Kistler E., Margesin R. Characterization of soil bacterial, archaeal and fungal communities inhabiting archaeological human-impacted layers at Monte Iato settlement (Sicily, Italy) // *Scientific Reports*. volume 8, Article number: 1903 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-20347-8

Southern P.M. Archaeology meets clinical microbiology: analysis of the microbial content of soil from archeological sites in Italy and Belize // *Science*, 39 (10). 2008, pp. 601-602

van Geel B, Buurman J., Brinkkemper O., Schelvis J., Aptroot A., van Reenen G., Hakbijl T. Environmental reconstruction of a Roman Period settlement site in Uitgeest (The Netherlands), with special reference to coprophilous fungi // *Archaeol. Sci.*, 30 (2003), pp. 873-883. doi:10.1016/S0305-4403(02)00265-0

van Geel B., Guthrie R., Altmann J., Broekens P., Bull I., Gill F., Jansen B., Nieman A., Gravendeel B. Mycological evidence of coprophagy from the feces of an Alaskan Late Glacial Mammoth // *Quat. Sci. Rev.*, 30. 2011., pp. 2289-2303. doi:10.1016/j.quascirev.2010.03.008

Weiner S (2010) *Microarchaeology: beyond the visible archaeological record*. Cambridge University Press, Cambridge.

[https://books.google.ru/books?hl=ru&lr=&id=QNawGfOp0PMC&oi=fnd&pg=PR17&ots=GIVdV-Qgmv&sig=HBZTpcqjmoKLE0GmAetHbaVh5Hc&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.ru/books?hl=ru&lr=&id=QNawGfOp0PMC&oi=fnd&pg=PR17&ots=GIVdV-Qgmv&sig=HBZTpcqjmoKLE0GmAetHbaVh5Hc&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Weiner S Archaeology, archaeological science, and integrative archaeology. *Isr J Earth Sci*. 2008. 56:57–61. doi: 10.1560/IJES.56.2-4.57

Wilkinson K., Stevens C. *Environmental archaeology. Approaches, techniques, applications*. Tempus, 2008. 314 p. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71303-8\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-71303-8_1)

Гак Е.И., Чернышева Е.В., Ходжаева А.К., Борисов А.В. Опыт выявления и систематизации инфраструктурных признаков поселения Рыкань-3 в лесостепном Подонье // *Российская археология*. 2014. № 4. С. 19–28.

<https://elibrary.ru/item.asp?id=22762439>