

Федеральное Агентство Научных Организаций
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБФМ РАН)

На правах рукописи

ЩЕРБАКОВА ВИКТОРИЯ АРТУРОВНА

**АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ И АРХЕИ В МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ
АРКТИКИ**

Специальность: 03.02.03 – Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Москва – 2018

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. КРИОБИОСФЕРА КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	14
1.1 Вечная мерзлота и криопэги.....	14
1.2 Микробное разнообразие многолетнемерзлых пород.....	20
1.2.1 Численность и разнообразие культивируемых микроорганизмов.....	20
1.2.2 Изучение микробного разнообразия вечномерзлых грунтов методами молекулярной экологии.....	25
ГЛАВА 2. АДАПТАЦИЯ ПРОКАРИОТ К ЖИЗНИ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ.....	27
2.1 Психрофильные прокариоты.....	27
2.2 Кинетика роста при низких температурах.....	28
2.3 Холодовой шок у психрофильных и психротолерантных бактерий.....	31
2.4 Роль компонентов клетки при адаптации к низкой температуре.....	32
2.4.1 Адаптация мембраны прокариотической клетки к низкой температуре...	32
2.4.2 Холодоактивные ферменты.....	35
2.4.3 Антифризные белки.....	36
2.5 Геномы психрофильных и психротрофных бактерий.....	42
ГЛАВА 3. ДОМЕН <i>ARCHAEA</i> : РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ.....	44
3.1 Происхождение и эволюция.....	44
3.2 Классификация архей.....	47
3.3 Методы изучения архейного разнообразия.....	53
3.4 Некультивируемое разнообразие архей в вечной мерзлоте.....	54
3.5. Метанобразующие археи.....	56
3.5.1 Общая характеристика и распространение.....	56
3.5.2 Современные представления о филогении метаногенов.....	59
3.5.2 Метаногенные археи из постоянно холодных экосистем.....	62
3.5.3 Метаногенные археи – модельные объекты для астробиологических исследований.....	64
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	67
4.1 Объекты исследования.....	67
4.2 Районы исследования и отбор проб.....	67
4.2.1 Гидрохимические характеристики криопэгов.....	69
4.3 Микроорганизмы.....	71
4.3.1 Методы учета численности бактерий.....	71
4.3.2 Состав сред, получение накопитительных и чистых культур.....	72
4.3.3 Методы контроля чистоты культур.....	76
4.3.4 Микроскопические методы исследования.....	76
4.3.5 Определение параметров роста микроорганизмов.....	77
4.3.6 Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов.....	78
4.4 Аналитические методы.....	78
4.4.1 Определение летучих жирных кислот, спиртов и газов.....	78
4.4.2 Определение лактата.....	79
4.4.3 Определение глюкозы.....	79
4.4.4 Определение сероводорода.....	79
4.4.5 Определение белка биомассы.....	80
4.4.6 Определение десульфовиридина, цитохромов и менахинонов.....	80

4.4.7	Определение ионов двухвалентного железа.....	81
4.4.8	Анализ жирнокислотного состава клеток и типа пептидогликана.....	81
4.4.9	Анализ липидного состава клеток.....	82
4.4.10	Определение азотфиксирующей активности.....	82
4.4.11	Определение антифризной активности.....	82
4.4.12	Определение структуры полисахаридов клеточных стенок <i>Psychrobacter</i> spp.....	82
4.4.13	Определение липазной активности.....	83
4.5.	Эксперименты по влиянию перхлоратов, УФ-облучения и вакуумирования на рост метаногенов.....	83
4.6	Анализ внутриклеточного полисахарида <i>Clostridium algariphilum</i>	83
4.7	Молекулярно-генетические методы исследования.....	85
4.7.1	Выделение и очистка геномной ДНК.....	85
4.7.2	Амплификация функциональных и 16S рРНК генов.....	86
4.7.3	Создание клоновых библиотек генов 16S рРНК и <i>mcrA</i>	87
4.7.4	Определение геномных последовательностей.....	88
4.7.5	Секвенирование.....	88
4.7.6.	Статистический анализ последовательностей.....	88
4.7.7.	Филогенетический анализ.....	89
4.7.8	Определение и расчет содержания ГЦ в ДНК.....	89
4.7.9	ДНК-ДНК гибридизация.....	89
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		
ГЛАВА 5. РАЗНООБРАЗИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ В ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЕ И КРИОПЭГАХ.....		
5.1	Численность анаэробных прокариот различных физиологических групп в вечной мерзлоте и криопэгах.....	90
5.1.1	Колымская низменность.....	94
5.1.2	Полуостров Варандей.....	95
5.1.3	Полуостров Ямал.....	95
5.2	Разнообразие архей в вечной мерзлоте Арктики.....	97
ГЛАВА 6. АНАЭРОБНЫЕ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ ИЗ МЕРЗЛЫХ ГРУНТОВ И КРИОПЭГОВ.....		
6.1	Сахаролитические анаэробные бактерии.....	106
6.2	Сульфатредуцирующие бактерии из арктических криопэгов.....	115
6.3	Диазотрофная бактерия из Ямальского криопэга.....	122
6.4	Факультативно-аэробные бактерии <i>Psychrobacter</i> sp.....	131
6.5	Описание бактерии-спутника <i>Methanosarcina</i> sp.	137
6.5.1	Геномика бактерий рода <i>Sphaerochaeta</i>	143
6.5.2	Влияние <i>S. associata</i> GLS2 ¹ на метаногенез <i>M.mazei</i> JL01.....	147
6.6	Метанобразующие археи.....	148
6.6.1	Водородиспользующие метаногены.....	148
6.6.2	Ацетатиспользующий штамм JL01	153
ГЛАВА 7 АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИЙ ИЗ КРИОПЭГОВ К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ		
7.1	Особенности роста выделенных бактерий при отрицательных температурах ...	164
7.1.1	Основные параметры роста выделенных из криопэга бактерий рода <i>Clostridium</i> при различных температурах.....	164
7.1.2	Образование продуктов метаболизма <i>C. algariphilum</i> при различных температурах культивирования.....	164
7.1.3	Влияние температуры и солености на скорость роста <i>C. algariphilum</i> и ' <i>P. muriicola</i> '.....	166
7.1.4	Влияние температуры культивирования на спектр утилизируемых	

субстратов <i>C. aloriphilum</i> и ' <i>P. muriicola</i> '	166
7.2 Состав жирных кислот клеток изолятов	168
7.2.1 Состав жирных кислот клеток <i>C. aloriphilum</i> при оптимальной и отрицательной температурах культивирования.....	169
7.2.2 Состав жирных кислот липидов мембран ' <i>P. muriicola</i> ' 2pS ^T при различных температурах культивирования и соленостях среды...	169
7.3 Внутриклеточный полисахарид <i>C. aloriphilum</i>	171
7.3.1 Состав и свойства.....	171
7.3.2 Условия накопления полисахарида в клетках.....	172
7.4 Образование антифризного белка <i>C. tagluense</i> A121 ^T	176
ГЛАВА 8. МЕТАНОГЕНЫ МЕРЗЛОТЫ – МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ АСТРОБИОЛОГИИ	179
8.1 Исследование влияния перхлоратов	180
8.2 Влияние ультрафиолетового облучения и вакуумирования.....	184
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	190
ВЫВОДЫ.....	192
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	194
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	235

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- TEM - трансмиссионная электронная микроскопия
- AOM - анаэробное окисление метана
- BKM – Всероссийская Коллекция Микроорганизмов
- DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур
- JCM – Японская коллекция микроорганизмов
- МС – масс-спектрометрия
- ANI - Average nucleotide identity, англ.
- ANME – anaerobic methanotroph, англ. анаэробный метанотроф
- OTE – операционная таксономическая единица
- SDS – додецил сульфат натрия
- ЦТАБ - цетилтриметиламмонийбромид
- п.о. – пар оснований
- OD – optical density англ. оптическая плотность
- ММО – многолетнемерзлые отложения
- дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфат
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- qPCR – количественная ПЦР, ПЦР «в реальном времени»
- FISH – fluorescent *in situ* hybridization англ. флуоресцентная гибридизация *in situ*
- СВБ – сульфатовосстанавливающие бактерии
- АТФ (АТФ) – аденозинтрифосфат
- IBP – Ice-Binding Protein, лед-связывающий белок
- AFPs – antifreeze proteins, антифризные белки
- ТН – термальный гистерезис
- ДГГЭ/ТГГЭ - денатурирующий/температурный градиентный гель-электрофорез
- ANME – анаэробные метанотрофы
- ЦПМ – цитоплазматическая мембрана
- SOR – супероксидредуктаза
- SOD – супероксиддисмутаза
- vs – лат. против
- $T_{\text{крит}}$ – критическая температура
- МПС – метод прямого счета
- МПР – метод предельных разведений
- ИК% – ингибирующая активность

СК% – контрольная скорость

ANI – сходство полных геномов

DDH – ДНК-ДНК гибридизация *in silico*

CFB – *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidets*

TACK – *Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota*

DRANN – *Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaea*

тыс. – тысяча

млн. - миллион

нм – нанометр

кл/г – клеток в грамме

мл - миллилитр

ВВЕДЕНИЕ

Вечная мерзлота – это осадочные породы, находящиеся при температуре ниже 0°C в течение двух или более лет (многолетнемерзлые отложения, ММО). Она представляет собой экосистему, которая напрямую зависит от стабильности климата нашей планеты. Вечная мерзлота занимает 20% поверхности Земли и, согласно оценкам (Schuur *et al.*, 2015), в ней содержится около 40% глобального пула углерода. Предполагается, что изменение климата в первую очередь повлияет на микробные сообщества позднеплейстоценового ледового комплекса (едома), широко распространенного как в Сибири, так и на Аляске, содержащего около 400 гига тонн углерода (Khvorostyanov *et al.*, 2008; Strauss *et al.*, 2013). Потепление может привести к изменениям в метаболической активности микроорганизмов и потенциально создать положительный тренд обратной связи: активизация микробиологических процессов вызовет увеличение эмиссии парниковых газов с поверхности арктической тундры, что, в свою очередь, приведет к увеличению темпов глобального потепления (Vincent 2010; Keven *et al.*, 2011; Graham *et al.*, 2012).

Возрастающий интерес к микроорганизмам - обитателям экстремальных экосистем объясняется также уникальностью свойств этих бактерий и архей, часто находящих применение на практике. Многолетнемерзлые отложения Арктики и Антарктики, характеризующиеся отрицательными температурами на протяжении геологического времени, долгое время считались стерильными. Исследование микроорганизмов вечной мерзлоты было инициировано Давидом Гиличинским в 90-е годы прошлого века, и до настоящего времени микробные сообщества этой экосистемы являются объектом пристального изучения в различных аспектах не только в нашей стране, но и за рубежом. Микробиологические исследования последних лет убедительно показали, что в вечной мерзлоте содержатся жизнеспособные микроорганизмы, и об этой части литосферы правомерно говорить как о части биосферы, для которой был предложен термин «криобиосфера» (Vorobyova *et al.*, 1997). Численность жизнеспособных микроорганизмов в вечномерзлых породах Арктики и Антарктики составила 10^3 - 10^8 кл/г (Rivkina *et al.*, 1998; Cowan *et al.*, 2002; Gilichinsky *et al.*, 2002; Steven *et al.*, 2004). Исходя из того, что в вечной мерзлоте находится значительное количество микробной биомассы, вклад микроорганизмов криобиосферы может быть весомым в глобальном круговороте веществ и в биогеохимических процессах и все еще остается неучтенным (Rivkina *et al.*, 2004; Gilichinsky and Rivkina, 2011).

Большинство планет Солнечной системы имеет криогенный характер, то есть физико-химические условия на них более или менее близки к условиям криосферы Земли. Поэтому

вечномерзлые грунты являются уникальной моделью такого внеземного местообитания для живых организмов (Гиличинский, 2002). Кроме того, исследования биоразнообразия вечной мерзлоты Земли позволяют отрабатывать методы стерильного отбора и хранения проб для исключения контаминации образцов с одной стороны, и методик обеспечения биологической безопасности с другой, необходимые для будущих астробиологических исследований.

Выживание микроорганизмов в условиях вечной мерзлоты поднимает вопрос о существовании временного предела сохранения жизни. Решить последнюю проблему экспериментально или при помощи моделирования невозможно. С этой точки зрения, многолетнемерзлые отложения являются уникальным объектом, позволяющим наблюдать результат криоконсервации в течение геологического времени.

Несмотря на низкие значения окислительно-восстановительного потенциала мерзлых отложений, до проведения настоящей работы не было известно ни одной анаэробной археи, и была описана лишь одна анаэробная бактерия (Вайнштейн *и др.*, 1995), выделенная из вечной мерзлоты. Тем не менее, открытие микробной жизни под поверхностью материков и в морских осадках показало, что значительная часть прокариот живет в глубинной биосфере, характеризующейся очень низкими потоками энергии (Kallmeyer *et al.*, 2012). Многолетнемерзлые грунты и криопэги (Vorobyova *et al.*, 1997) также можно отнести к подобным экосистемам. Термодинамический анализ показал (Valentine, 2008), что теоретическая минимальная энергия, которая необходима для поддержания метаболизма прокариотных клеток в анаэробных условиях почти в 13 раз ниже по сравнению с кислородными средами, так как анаэробные микроорганизмы используют менее энергоемкие пути биосинтеза (Hoehler and Jorgensen, 2013). Таким образом, для экосистем вечной мерзлоты важны поиск и исследования анаэробных бактерий и архей, которые, возможно, более приспособлены к условиям, обеспечивающим минимальную энергию для поддержания основных клеточных функций.

Исследованиями, выполненными в России, впервые установлено, что вечномерзлые отложения Арктики и Антарктиды являются обитаемыми (Абызов *и др.*, 1979; Звягинцев *и др.*, 1985; Гиличинский *и др.*, 1989; Gilichinsky *et al.*, 1995), и жизнеспособные микроорганизмы сохраняются в мерзлых породах и льдах сотни тысяч и даже миллионы лет. Изучение микробных сообществ ММО стало возможным благодаря внедрению Д.А. Гиличинским метода колонкового бурения мерзлых пород без промывки и химических реагентов, что обеспечивало стерильный отбор образцов для микробиологических анализов (Shi *et al.*, 1999). Изучение жизнеспособных микроорганизмов в вечной мерзлоте показало,

что отрицательные температуры и стабильный физико-химический режим мерзлых толщ благоприятствуют сохранению микроорганизмов и их адаптационная стратегия (Gilichinsky, 2002) позволяет выживать в лабораторных условиях. Кроме того, в вечной мерзлоте Арктики были обнаружены изолированные водные экосистемы поздне – и среднеплейстоценового возраста, залегающие на глубине нескольких десятков метров в виде линз высокоминерализованных отрицательно-температурных вод - криопэггов. Линзы рассолов в вечной мерзлоте являются единственным объектом на Земле, характеризующимся постоянной отрицательной температурой, высокой соленостью и изолированностью от воздействия внешних факторов на протяжении геологического времени. Поиск и изучение микроорганизмов, способных существовать в подобных экосистемах, является важной фундаментальной задачей не только общей биологии, но и астробиологии, так как на планетах криогенного типа свободная вода может существовать лишь при условии ее высокой минерализации.

К моменту начала выполнения работы из проб вечномерзлых грунтов были выделены чистые культуры актиномицетов (Карасев *и др.*, 1998; Gavrish *et al.*, 2003), нитрифицирующих бактерий (Соина *и др.*, 1991), зеленых одноклеточных водорослей и цианобактерий (Vishnivetskaya *et al.*, 2001), а также сульфатвосстанавливающая бактерия (Вайнштейн *и др.*, 1995). Ряд изолятов и смешанные популяции проявляли метаболическую активность при отрицательных температурах (Ривкина *и др.*, 2002; Хмеленина *и др.*, 2002; Bakermans *et al.*, 2003). В нашей стране исследование процессов анаэробного разложения органического вещества и микроорганизмов, участвующих в этих процессах, впервые были осуществлены Г.А. Заварзиным, М.В. Ивановым и их учениками в 70-е годы прошлого столетия. Однако изучение особенностей этого процесса в холодных экосистемах были ограничены зонами тундровых болот и антропогенными местами обитания.

В нашей стране исследование процессов анаэробного разложения органического вещества и микроорганизмов, участвующих в этих процессах, впервые были осуществлены Г.А. Заварзиным, М.В. Ивановым и их учениками в 70-е годы прошлого столетия. Однако изучение особенностей этого процесса в холодных экосистемах были ограничены зонами тундровых болот и антропогенными местами обитания.

В связи с угрозой глобального потепления и, как следствия, таяния вечной мерзлоты и эмиссии парниковых газов в атмосферу с начала 2000-х годов США (Университет Аляски), Канада (Университет МакГилла) и Германия (Центр Полярных исследований, Потсдам) проводят масштабное изучение экосистем высокоширотной Арктики. Все эти работы, в основном, базируются на изучении современных арктических почв и самых верхних

горизонтов мерзлых отложений (Wagner *et al.*, 2003, 2005; Ganzert *et al.*, 2007; Steven *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2010; Taş *et al.*, 2014; Allan *et al.*, 2014; Schädel *et al.*, 2016). Немецкие ученые исследовали микробное разнообразие в морских мерзлых осадках в дельте реки Лена (море Лаптевых, Россия) и описали новый вид метаногенов – *Methanosarcina soligelidi*, выделенный из сезонноталого горизонта ММО (Wagner *et al.*, 2013).

Цель работы состояла в исследовании анаэробных бактерий и архей как части прокариотных микробных сообществ многолетнемерзлых отложений Арктики различного возраста и происхождения; характеристике и изучении особенностей биологии выделенных таксонов.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. определение численности микроорганизмов в образцах вечной мерзлоты и криопэггов;
2. исследование разнообразия архей в образцах многолетнемерзлых отложений Арктики, содержащих метан;
3. выделение чистых культур анаэробных бактерий и архей, изучение их физиолого-биохимических свойств, определение таксономического положения изолятов;
4. получение и анализ геномов некоторых представителей анаэробных прокариот, выделенных из мерзлых пород и криопэггов;
5. изучение способов адаптации арктических изолятов к условиям обитания;
6. исследование возможности использования метанобразующих архей из вечной мерзлоты в качестве модельных организмов для решения проблем астробиологии.

Научная новизна и значимость работы

Микробиологический анализ многолетнемерзлых грунтов и криопэггов различного возраста показал, что эти экстремальные экосистемы населены криофильными прокариотами, включающими анаэробные бактерии различных физиологических групп. Выявлено разнообразие архей в вечной мерзлоте Арктики различного возраста (до 32000 лет), представленное филумами *Euryarchaeota*, *Bathyarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Woesearchaeota*. Обнаружено увеличение архейного разнообразия с глубиной и присутствие среди метаногенных филотипов порядка *Methanosarcinales* представителей семейства ‘*Candidatus Methanoperedenaceae*’, которые могут участвовать в процессе окисления метана.

Выделены и охарактеризованы чистые культуры адаптированных к холоду анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий, представляющих новые виды родов *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Psychrobacter* и *Celerinatantimonas*. Секвенированы геномы четырех

выделенных бактерий и архей. Охарактеризованы новые виды метанобразующих архей рода *Methanobacterium*, таксономическая обособленность которых подтверждена сравнением фенотипических характеристик и геномных последовательностей. Бинарная метанобразующая культура, полученная из голоценовых отложений Арктики, состояла из метаногена *Methanosarcina mazei* JL01, отличающегося от типового штамма вида более низким температурным оптимумом роста, и бактерии *Sphaerochaeta associata* GLS2^T sp.nov. Полученные полные геномы археи и бактерии позволили обнаружить причины их тесной кооперации.

Показано, что все изоляты были способны расти при 0°C или ниже, а их рост при пониженных или отрицательных температурах сопровождался значительными изменениями физиологии и биохимического состава клеток.

Исследование влияние окислителей (перхлоратов), импульсного УФ-излучения и вакуумирования на рост и метаногенез метанообразующих архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников, позволило обнаружить, что метаногены из мерзлоты более устойчивы к действию окислителей и ультрафиолета. Кроме того, впервые обнаружены свидетельства о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Показано, что влияние УФ-излучения на рост метаногенов зависит от его интенсивности и приводит к цитологическим изменениям в клетках, исследованных архей.

Практическое значение работы

Все выделенные из изученных экосистем микроорганизмы адаптированы к холоду и представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих веществ в холодном климате. Полученные данные об антифризном белке *Clostridium tagluense* A121^T и наличии липазной активности в исследованных бактериях, выделенных из мерзлых грунтов и криопэггов, позволяют рассматривать коллекцию арктических изолятов, как возможный источник холодоактивных ферментов, используемых в пищевой промышленности и в молекулярной биологии. Выделенные и описанные в работе прокариоты помещены в российскую (VKM) и зарубежные (DSMZ и JCM) коллекции микроорганизмов и доступны для научной общественности как объекты для дальнейших исследований.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на Международной конференции «Консервация и трансформация вещества и энергии в криосфере Земли» 1-5 июня 2001, Пушино; Международной конференции “Astrobiology Expeditions 2002”, St. Petersburg. March 22-24, 2002; International Workshop “Water in the Upper Martian Surface”.

April 17-19. 2002, Potsdam, Germany; International Workshop on Exo-Astrobiology. Madrid, Spain 18-20 November 2003; International Conference on Arctic Microbiology, March 23-25, 2004, Rovaniemi, Finland; Международная конференция Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биологический потенциал. "ICOMID-2005" 20-25 сентября 2005, Пермь, Россия; 2nd European Conference on Permafrost, Potsdam, Germany, 2005; The 9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, 2005; Всероссийских Молодежных школах-конференциях «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005, 2006); International Conference on Alpine and Polar Microbiology. Austria, Innsbruck, March 27-31, 2006; Annual meeting of Japanese Society for Biological Sciences in Space (JSBSS), Sendai, Japan, September 17-18, 2010; EANA meeting, September 6-8, 2010, Pushchino, Russia; Astrobiology Science Conference Evolution and Life: Surviving Catastrophes and Extremes on Earth and beyond. April, 26-29, 2010, League City, Texas, USA; AGU Fall Meeting, San Francisco, 15-19 December 2014, USA; 2nd International Ice-Binding Protein Conference, August 4-7, 2014, Sapporo, Japan; 7-ой, 8-ой, 9-ой, 12-й, 13-й, 19-ой и 21-ой Пушинских конференциях молодых ученых «Биология-наука 21-го века» (2003, 2004, 2005, 2009, 2012, 2013, 2015 и 2017); The 5th и 7th FEMS Congress of European Microbiologists – 2013, 2017, на 10-м и 11-ом международных конгрессах "Extremophiles 2014" (Санкт-Петербург, Россия) и "Extremophiles 2016" (Киото, Япония), 6-й Международной конференции «Polar and Alpine Microbiology», Ческе-Будеевице, Чехия, 2015.

Публикации. Материалы диссертации представлены в 58 работах: опубликовано 32 статьи и 26 тезисов докладов.

Место проведения работы. Основная часть работы выполнялась в ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), вначале в лаборатории анаэробного метаболизма микроорганизмов (зав. лабораторией проф., д.б.н. В. К. Акименко), а затем в лаборатории анаэробных микроорганизмов отдела «Всероссийская коллекция микроорганизмов» (зав. отделом д.б.н. Л.И. Евтушенко). Образцы для совместных исследований, а также их физико-химическая и геологическая характеристика были получены в лаборатории криологии почв ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН под руководством д.б.н. Д.А. Гиличинского (1996-2012 гг) и впоследствии к.г.-м.н. Е.М. Ривкиной. Получение клоновых библиотек и исследование антифризных белков проводили в Национальном институте полярных исследований, г. Токио, Япония в сотрудничестве с проф. И. Йошимурой. Влияние УФ-облучения и вакуумирования исследовали совместно с к.б.н Дешевой Е.А., ГНЦ РФ ИМБП РАН. Электронно-микроскопические исследования

проводились в ИБФМ РАН совместно с к.б.н. Н.Е. Сузиной и к.б.н. Т.А. Абашиной. Исследования состава жирных кислот клеточных стенок проводились совместно с д.б.н. Г.А. Осиповым, Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева и А.Н. Новиковым, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. На отдельных этапах в работе принимали участие сотрудники ИБФМ РАН к.б.н. Н.А. Чувильская, к.б.н. К. С. Лауринавичюс, к.б.н. О.В. Архипова, н.с. Н.Г. Винокурова, к.б.н. Е.В. Арискина, н.с. Б.П. Баскунов, к.б.н. Я.В. Рыжманова, к.б.н., О.Ю. Трошина, к.б.н. А.Г. Захарюк, инж. Г.А. Солдатенкова и м.н.с. Ошуркова В.И. Автор выражает глубокую признательность всем участникам работы, а также всем сотрудникам лаборатории анаэробных микроорганизмов за поддержку и помощь в этой работе.

Работа выполнялась при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проекты №№ 96-05-65226, 01-04-49084; 03-04-48719; 06-04-49011; 08-04-01004 и 15-04-08612).

Личный вклад соискателя состоял в постановке проблемы, выборе методов исследований, личном участии в лабораторных экспериментах и научном руководстве студентами и аспирантами, выполняющими работы по защищаемой теме, а также в координации действий с соисполнителями, обобщении и интерпретации результатов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 248 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 513 ссылок, содержит 37 таблиц и 50 рисунков. Дополнительные результаты изложены в трех приложениях.

Основные защищаемые положения:

- (1) анаэробные прокариоты распространены в многолетнемерзлых грунтах и криопэгах Арктики, характеризующихся различным возрастом и происхождением;
- (2) в вечной мерзлоте присутствуют представители как психрофильных, так и мезофильных таксонов микроорганизмов, для которых характерно наличие более широкого диапазона температур для роста;
- (3) в многолетнемерзлых породах различного возраста и генезиса обнаружены культивируемые археи, в том числе водородиспользующие и ацетокластические метаногены, участвующие в образовании метана при отрицательных температурах;
- (4) анаэробные бактерии вечной мерзлоты адаптированы к воздействию физико-химических факторов среды обитания;

- (5) метаногенные археи, в том числе выделенные из мерзлоты, могут быть использованы в качестве модельных объектов для решения проблем астробиологии, а анаэробные холодоустойчивые бактерии могут быть источником ферментов, активных при низких температурах.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
ГЛАВА 1. КРИОСФЕРА КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1 Вечная мерзлота и криопэги

По оценкам специалистов многолетнемерзлые отложения (ММО, «вечная мерзлота») занимают около 25% земной поверхности и в классическом понимании представляют собой отложения, температурный режим которых сохраняется при 0°C или ниже на протяжении двух лет и более (Gilichinsky, 2002; Jansson and Taş, 2014). Россия занимает первое место в мире (Ran *et al.*, 2012) по площади многолетнемерзлых отложений, которые составляют около 65% ее территории. Всю совокупность вечномерзлых пород принято называть криосферой, или криолитосферой.

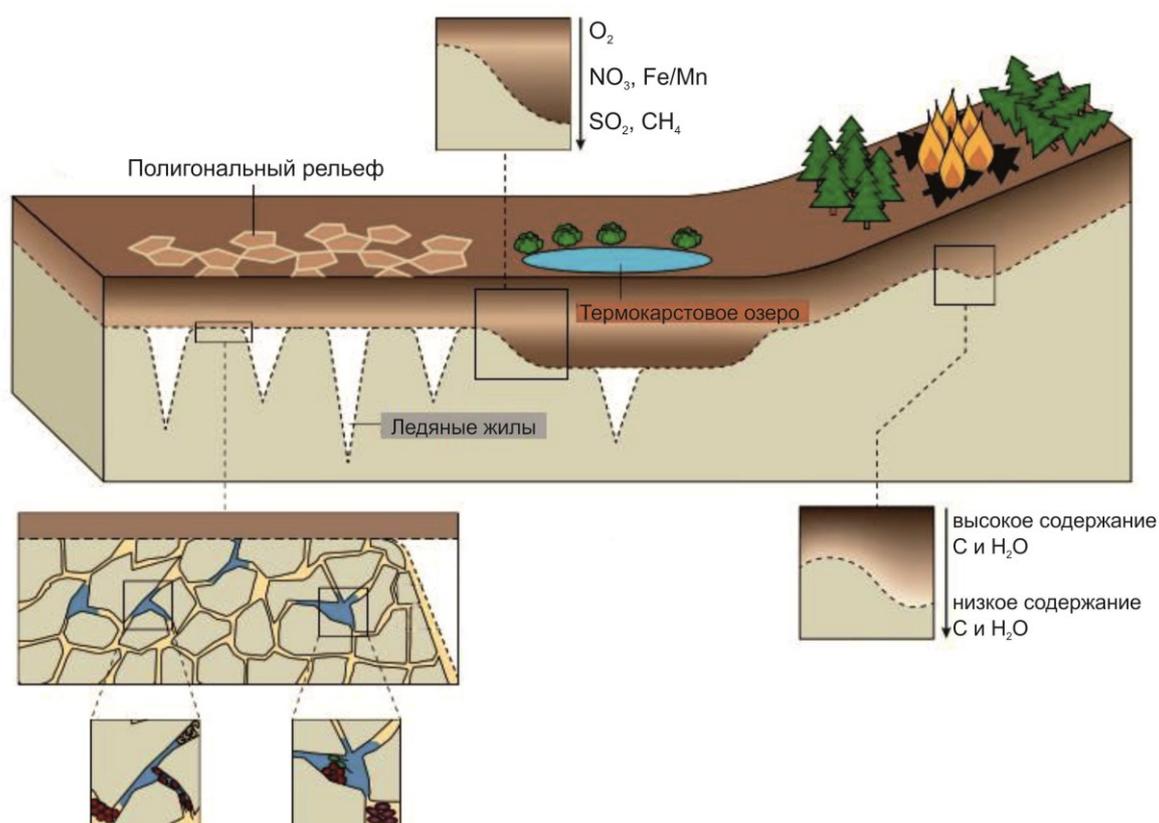


Рис. 1. Структура многолетнемерзлых отложений, модифицировано по Jansson and Tas, 2014.

Вечную мерзлоту от других низкотемпературных сред, таких как морской лед, ледники и глубинные морские и пресноводные осадки, отличает то, что она гетерогенна по своей

структуре и представлена разными типами в различных географических районах. Различия существуют не только в структуре вечной мерзлоты, а также в ее возрасте и содержании органического вещества. Вечную мерзлоту разделяют на несколько горизонтов в зависимости от температуры *in situ* и глубины залегания. Активный или сезонно-талый слой варьирует от нескольких сантиметров в Арктике до 2-3 метров в субарктических регионах и подвергается сезонным циклам замораживания-оттаивания. Для него также характерно протекание интенсивных физико-химических процессов (Ostroumov, 2004). Его температурный режим составляет от +15 до -35°C в зависимости от сезона. Граница между сезонно-талым слоем и вечной мерзлотой называется кровлей вечной мерзлоты. Кровля вечной мерзлоты действует как физический и биогеохимический барьер, который ограничивает проникновение поверхностных вод и влияние внешних факторов окружающей среды (Gilichinsky, 2002). Это переходная зона, представляющая собой мерзлые отложения толщиной от 10 до 20 метров с сезонными температурными колебаниями от 0 до -15°C, и отделяющая активный слой от более глубокого и стабильного горизонта мерзлоты, температурный режим которого составляет от -5 до -10°C (French, 1996; Jansson and Taş, 2014). Внутри вечномерзлых грунтов существуют различные относительно обособленные структуры, такие как талики, ледяные жилы и криопэги, формирование которых зависит от температурных условий и происхождения осадочных пород (рис. 1).

Талики - Незамерзающие участки породы внутри мерзлой толщи, имеющие различное происхождение, называются таликами. Ледяные жилы обычно встречаются в тундровых экосистемах и представляют собой трещины, которые образуются в холодный зимний сезон, а весной заполняются талой водой. Повторное растрескивание, наполнение водой и замерзание приводит к образованию полигонального микрорельефа с ледяными клиньями шириной в несколько метров и несколькими десятками метров в глубину. Такая структура сохраняется на протяжении геологического времени и называется ледовым комплексом (van Everdingen, 2005). Большой интерес у исследователей вызывает позднеплейстоценовый ледовый комплекс (едома) восточно-сибирских прибрежных равнин (Лена-Анабар, Яна-Индигирка и Колымская низменность) (Schirrmeister *et al.*, 2011). Анализ образцов этого образования, возраст которых составляет примерно 28000 лет, показал присутствие метана в концентрации 1.0 ммоль кг⁻¹ (Rivkina *et al.*, 2016). По оценкам исследователей это богатый органическим веществом массив, в котором содержится около 400 гигатонн углерода (Khorostyanov *et al.*, 2008; Strauss *et al.*, 2013).

Сравнение физико-химических характеристик мерзлых грунтов различных полярных регионов показало, что температура в вечномерзлых почвах Арктики варьирует от 0 до -

17°C, в то время как в Антарктике от -18 до -27 °C. Содержание органического вещества колеблется от 0.35 до 10%. Отложения характеризуются нейтральным pH, их окислительно-восстановительный потенциал находится в пределах от +40 до -256 мВ, а соленость не превышает 5-7%. В целом, исследованные пробы вечномёрзлых грунтов Антарктики содержат намного меньше органического вещества, имеют более щелочной pH и более высокий окислительно-восстановительный потенциал. Концентрация кислорода и азота в породах были такими же, как и в атмосфере, в то время как концентрация метана и углекислого газа значительно выше (табл.1).

Таблица 1. Физико-химические свойства вечномёрзлых грунтов различных регионов.

Географическое положение	Глубина, м	Возраст	T, °C	pH	C _{орг} , % от сухого веса грунта	Ссылка
Арктика, Колымская низменность, Сибирь	0-100	от современного до 5 млн лет	-7...-11	5.6–7.8	0.35-10	Vorobyova <i>et al.</i> , 1997 Shi <i>et al.</i> , 1997 Vishnivetskaya <i>et al.</i> 2000
Арктика, Канада	0-15	от современного до 20 тыс лет	-10...-17	6.5	2.19	Steven <i>et al.</i> , 2006
Антарктика	0-17	150 тыс. – 2 млн лет	-18...-27	7.8–9.8	0.043	Vorobyova <i>et al.</i> , 1997

Отрицательные температуры не предотвращают образование незамерзшей воды вокруг частиц мерзлой породы, существующей в виде тонких пленок. Толщина пленок зависит от температуры: при -1.5°C она может быть 15 нм, а при -10°C - до 5 нм (Rivkina *et al.*, 2000). Известно, что наличие пленок незамерзшей воды является очень важным фактором для микроорганизмов. Было высказано предположение, что они защищают живые клетки от повреждения кристаллами льда и служат в качестве питательной среды. Кроме того, пленки обеспечивают необходимый для поддержания жизнедеятельности массоперенос (Gilichinsky, 2002).

Таким образом, вечная мерзлота является природной многофазной экосистемой, состоящей из различных по своим свойствам компонентов, препятствующих движению микроорганизмов и смешиванию субстратов, что стимулирует образование пространственно отдельных микроколоний, которые вынуждены адаптироваться к внешним условиям, и, возможно, участвуют в микроэволюционных процессах.

Криопэги представляют собой незамерзшие грунты и линзы свободной воды, находящиеся в толще многолетнемерзлых пород и характеризующиеся постоянно отрицательной температурой. Эти образования широко распространены в Арктике. Происхождение криопэгов связано с промерзанием отложений морского генезиса различного возраста. Несколько десятков тысяч лет назад накопление донных осадков сопровождалось процессами метанобразования. Оно происходило в условиях похолодания, шло в сублиторальной зоне моря на малых глубинах при низкой солености и положительных температурах, близких к нулю (рис.2).

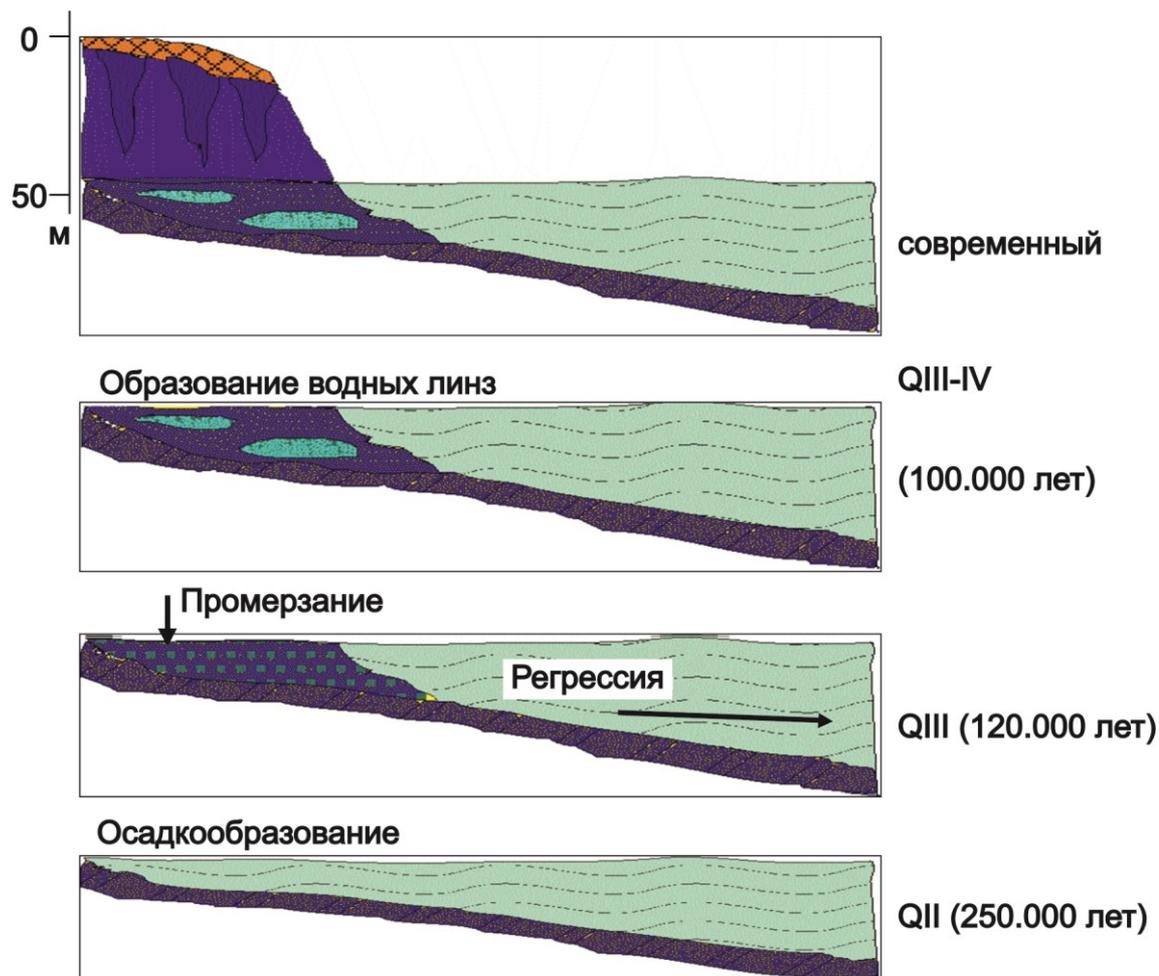


Рис. 2. Схема образования арктических криопэгов морского типа. Адаптировано по Gilichinsky *et al.*, 2003.

После регрессии Полярного океана донные осадки, насыщенные водой и метаном, перешли в субаэральное состояние и промерзли. Начальный этап замерзания сопровождался миграцией, а также отжатием воды и газа фронтом промерзания сверху к низам горизонта. Затем шло вымораживание воды из осадков, что привело к повышению минерализации остаточного раствора. Постепенно формировались локальные линзы, содержащие отрицательно температурный рассол - криопэги. Впоследствии горизонт морских отложений

перекрыли терригенные осадки, формировавшиеся в суровом холодном климате. Гидрохимический анализ криопэггов, образующихся в породах с морским типом засоления, позволяет восстановить температуру их формирования (Фотиев, 1997). Эти расчеты показали, что криогенная метаморфизация пород и подземных вод происходила при температуре ниже современных температур вмещающих пород. Разрез, представленный на верхней части рис. 2, венчает синкриогенный ледовый комплекс. Наличие в нем мощных полигонально-жильных льдов является доказательством того, что ни ледовый комплекс, ни подстилающий его горизонт морских отложений с линзами криопэггов впоследствии не протаивали. Сформированные таким образом линзы находятся на различной глубине. Их толщина составляет от 0.5 до 1.5 м, ширина 3-5 м. Окислительно-восстановительный потенциал отражает анаэробные условия, что характерно для мерзлоты на такой глубине. Следует отметить, что криопэги более молодого возраста могут иметь гидравлическую связь с поверхностными водоемами (озерами и морем), что снижает их минерализацию.

Минеральный состав криопэггов разнообразен и отличается от состава других водных экосистем (табл. 2). По концентрации анионов и катионов вода криопэггов напоминает в 4-5 раз концентрированную морскую воду.

Таблица 2. Ионный состав некоторых соленых местообитаний.

Ионы	Концентрация, г/л				Криопэги, Колымская низменность
	Великое соленое озеро	Мертвое море	Содовые озера	Морская вода	
Na ⁺	105	40.1	142	10.6	35.0
K ⁺	6.7	7.7	2.3	0.38	0.93
Mg ²⁺	11	44	<0.1	1.27	8.0
Ca ²⁺	0.3	17.2	<0.1	0.40	1.56
Cl ⁻	181	225	155	18.9	99.4
Br ⁻	0.2	5.3	0	0.065	н.о.*
SO ₄ ²⁻	27	0.5	23	2.65	4.0
HCO ₃ ³⁻ или CO ₃ ³⁻	0.7	0.2	67	0.14	0.59
pH	7.7	6.1	11	8.1	7.2-7.9

* - не определяли

Криопэги - единственно возможный вид свободной воды в мерзлых толщах Марса. В ноахидское время (4.6-3.7 млрд. лет назад) впадину его северного полушария занимал океан, многие депрессии были заняты морями, при промерзании донных отложений которых в

гесперийское время (4.6-3.7 млрд. лет назад) могли формироваться криопэги (Демидов *и др.*, 2012). В это время морские осадки были перекрыты мощными покровами площадных излияний базальтов, сделав их недоступными для исследований. Вплоть до позднегесперийского времени на северных равнинах могли периодически возникать прибрежные моря, подпитываемые каналами, но морские отложения здесь не обнаружены (Carr, 2006). Образование криопэгов не обязательно происходило синхронно с первым выходом морских осадков на поверхность - вода могла проникать в древние солесодержащие отложения и, растворяя их, образовать криопэги. С термодинамической точки зрения, существование линз свободной воды в виде рассола в верхней части разреза Марса маловероятно. Температура здесь ниже -75°C , а температура замерзания хлоридно-магниевого рассола составляет -68.6°C (Marion *et al.*, 2010). Исходя из температурного градиента $10^{\circ}\text{C}/\text{км}$, криопэги могут существовать в мерзлотных районах Марса только за пределами первого километра от поверхности. В подмерзлотных водах Марса с наибольшей вероятностью можно ожидать присутствие рассолов, формирующих не разобщенные линзы, а протяженные связанные водоносные горизонты. В этом случае при промерзании пресная вода кристаллизовалась в виде льда, образуя мерзлые породы, а соли отжимались в подмерзлотные горизонты. Это известный процесс криогенного концентрирования, который в марсианских условиях может быть значительным за счет большого объема воды, подвергшейся промерзанию (Демидов *и др.*, 2012).

Перспективы открытия жизни вне Земли инициируют исследования земных объектов, условия существования в которых подобны таковым на планетах криогенного типа. Чтобы быть удобной моделью для экзобиологии, такие объекты должны являться изолированными экосистемами с постоянно отрицательной температурой. Для существования жизни абсолютно необходима свободная вода. При отрицательных температурах она может находиться в них только в высокоминерализованном состоянии. Всем этим требованиям удовлетворяют криопэги (Gilichinsky *et al.*, 2003). Как следствие, возник интерес к микроорганизмам рассолов в вечной мерзлоте, поскольку они (если будут обнаружены) могут рассматриваться как потенциальные обитатели внеземных экосистем, а их физиолого-биохимические особенности - как стратегии выживания на планетах криогенного типа.

1.2 Микробное разнообразие вечномёрзлых пород

1.2.1 Численность и разнообразие культивируемых микроорганизмов

Омелянский в 1911 году первым сообщил о присутствии в мерзлоте жизнеспособных микроорганизмов (цит. по Wagner *et al.*, 2008). Пионерские исследования по подсчету клеток и выявлению разных типов микроорганизмов показали, что в активном слое и более глубоких мерзлых отложениях присутствует значительное количество и разнообразие жизнеспособных микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи, грибы и простейшие (James and Southerland 1942; Boyd and Boyd 1964). С тех пор был проведен ряд исследований, направленных на изучение распространения и физиологии микроорганизмов в различных многолетнемерзлых экосистемах (Хлебникова и др., 1990, Rivkina *et al.*, 2000; Kobabe *et al.*, 2004; Gilichinsky *et al.*, 2005; Zak and Kling 2006; Liebner and Wagner 2007). В 80-х годах под руководством заведующего лабораторией криобиологии почв д.г.-м.н. Давида Гиличинского были инициированы микробиологические исследования в арктических мерзлотных почвах и многолетнемерзлых отложениях, в результате которых разработанные методы безжидкостного бурения в сочетании с использованием бактериального метчика *Serratia marcescens* (Хлебникова и др., 1990; Shi *et al.*, 1997) показали отсутствие контаминирующей микрофлоры в исследуемых образцах. Это дало основание считать, что жизнеспособные организмы не привнесены извне, а находятся в образцах *in situ.*, а возраст микроорганизмов соответствует продолжительности мерзлого состояния отложений. Наиболее древние клетки были обнаружены в многолетнемерзлых отложениях на северо-востоке Сибири (2-3 млн. лет) при температуре пород -10...-12°C.

К классическим методам идентификации микроорганизмов относятся выделение чистых культур и установление их таксономического статуса. С помощью данных методов из тундровой зоны Арктики были получены культивируемые микроорганизмы различных физиологических групп. Основными и часто идентифицируемыми родами являются *Acetobacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Methanosarcina*, *Methylobacter*, *Micrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Streptomyces* (Gilichinsky *et al.*, 1995; Kotsyurbenko *et al.*, 1995; Omelchenko *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Simankova *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Warttinen *et al.*, 2006). В последние годы описаны новые бактерии таксонов различного уровня *Alphaproteobacteria* (Berestovskaya *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012b; Dedysh *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016; Piao *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017), *Acidobacteria* (Männistö *et al.*, 2011; 2012; Belova *et al.*, 2018), *Planctomycetes* (Kulichevskaya *et al.*, 2016; Kulichevskaya *et al.*, 2017),

Verrucomicrobia (Jiang *et al.*, 2012c; Kim *et al.*, 2015) и *Firmicutes* (Nelson *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012a; Jiang *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2015; Gyeong *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018).

Исследование многолетнемерзлых грунтов определенное путем прямого счета под микроскопом с использованием различных способов окрашивания препаратов показало, что общее количество микроорганизмов, составило 10^5 - 10^6 кл/г для проб антарктических грунтов (Cowan *et al.*, 2002; Gilichinsky *et al.*, 2007), 10^7 кл/г для проб арктических грунтов Канады (Steven *et al.*, 2004) и 10^3 - 10^8 кл/г для проб арктических грунтов Сибири (Rivkina *et al.*, 1998; Gilichinsky, 2002).

Таблица 3. Общий счет и количество жизнеспособных микроорганизмов в вечной мерзлоте различной географической локализации.

Место отбора проб, тип образца	Общее количество, кл/г	Количество жизнеспособных клеток, кл/г	Ссылка
Антарктика, грунт	10^5 - 10^6	0 - 10^5	Cowan <i>et al.</i> , 2002 Gilichinsky <i>et al.</i> , 2007
Сибирь, грунт	10^3 - 10^8	0 - 10^8	Rivkina <i>et al.</i> , 1998; Gilichinsky <i>et al.</i> , 2002
Канада, грунт	10^7	10^1 - 10^3	Steven <i>et al.</i> , 2004
Гренландия, грунт	10^7	10^2	Miteva <i>et al.</i> , 2004
Тянь-Шань, Китай, грунт	н.о.*	2.5 - 6.0×10^5	Bai <i>et al.</i> , 2006
Аляска, жильный лед	н.о	10^5 - 10^6	Katayama <i>et al.</i> , 2007

* - не определяли.

Количество жизнеспособных бактерий, определенное, главным образом, при посеве на богатые среды, варьировало от 0 до 10^8 кл/г (табл. 3), но, в целом, было меньше, чем результаты общего счета. Было отмечено, что количество жизнеспособных микроорганизмов зависит не от температуры вечномерзлых грунтов, а от их возраста. Так, по мере увеличения возраста пород оно уменьшалось, и возрастало количество стерильных проб, что навело авторов на мысль о существовании предела времени, в течение которого клетки могут поддерживать жизнеспособность, находясь в вечномерзлых грунтах (Гиличинский *и др.*, 1989; Хлебникова *и др.*, 1990).

Прокариоты. Среди бактерий, выделенных из образцов вечномерзлых грунтов Колымской низменности, наиболее часто встречались коринеформные (85%) и коккоидные (5%) формы, среди которых доминировали бактерии родов *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Deinococcus*, *Brevibacterium* и *Streptomyces*. Неспорообразующие грамотрицательные палочки (12%) в большинстве своем были представлены родами *Pseudomonas* и *Flavobacterium* (Zvyagintsev, 1995; Vorobyova *et. al.*, 1997). В образцах позднелайстоценового (1.8–3 млн. лет) возраста доминировали актиномицеты, принадлежащие к родам *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Aureobacterium*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Streptomyces* и *Propionibacterium* (Карасев *и др.*, 1998). Использование селективных питательных сред также позволило выделить сульфатвосстанавливающую бактерию *Desulfotomaculum* sp. (Вайнштейн *и др.*, 1995), позже переопределенную в *Desulfosporosinus hippei* (Vatsurina *et al.*, 2008), нитрифицирующие бактерии родов *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* и *Nitrobacter* (Соина *и др.*, 1991) и пурпурную несерную фотосинтезирующую бактерию рода *Rhodopseudomonas* (Бурашникова и Гоготов, 1994). Изучение фенотипических характеристик пигментированных бактерий, выделенных из образцов вечной мерзлоты и определенных как представители рода *Brevibacterium*, показало, что три выделенных штамма представляли три новых вида этого рода (Гавриш *и др.*, 2004). Исследование нескольких образцов этого же района, позволило впервые обнаружить бактерии родов *Williamsia*, *Bradyrhizobium*, *Filomicrobium* и *Hansschlegelia* (Кудряшова *и др.*, 2013).

Среди спорообразующих бактерий, выделенных из многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, были идентифицированы пять штаммов, относящихся к роду *Bacillus*. Штаммы были близки к современным представителям *B.pumilus*, *B.circulans*, *B.megaterium* и *B.sphaericus*, но отличались содержанием ГЦ-пар в ДНК и характеризовались низким уровнем ДНК-ДНК гибридизации. Два штамма, отнесенные к *B.pumilus*, проявили гемолитическую активность к человеческим эритроцитам, что известно только для антраксподобной группы, включающей виды *B.cereus*, *B.thuringiensis*, *B.mycoides* и *B.anthraxis* (Кузьмин *и др.*, 1996).

В образцах Арктических многолетнемерзлых отложений плиоцен-плейстоценового возраста были обнаружены древние фототрофы: цианобактерии и зеленые водоросли, клетки которых в полной темноте сохранили свой фотосинтетический аппарат. Чистые культуры зеленых водорослей были отнесены к родам *Chlorella*, *Stichococcus*, *Chlorococcum* в пределах порядка *Chlorococcales*. Нитчатые цианобактерии отнесены к порядку *Oscillatoriales*, родам *Oscillatoria* и *Phormidium*. Реже встречались представители порядка *Nostocales*: было

выделено только два штамма, представляющие роды *Nostoc* и *Anabaena* (Vishnivetskaya *et al.*, 2001).

Кроме того, имеются исследования, описывающие культивируемое разнообразие вечной мерзлоты без установления точного таксономического статуса изолятов. Так, в работе Ши с соавторами (Shi *et al.*, 1997) изоляты из вечной мерзлоты северо-восточной Сибири были отнесены к четырем филумам эубактерий – грамположительные бактерии с высоким и низким содержанием Г+Ц пар, β-протеобактерии и γ-протеобактерии. При этом большинство грамположительных бактерий с высоким содержанием Г+Ц пар, β-протеобактерий и все γ-протеобактерии были выделены из проб возрастом 1.8-3.0 млн.лет, а большинство грамположительных бактерий с низким содержанием Г+Ц пар – из проб возрастом 5-8 тыс.лет. Изоляты из вечной мерзлоты альпийского пояса Тянь-Шаня (северо-западный Китай) являлись представителями грамположительных бактерий с высоким и низким содержанием Г+Ц пар, протеобактерий и филума *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB), причем доминировали члены первой группы, относящиеся к роду *Arthrobacter* (Bai *et al.*, 2006). Изоляты из жильного льда вечной мерзлоты Аляски принадлежали к трем филумам - *Actinobacteria*, *Bacilli* и *γ-Proteobacteria* и были близкородственны родам *Arthrobacter*, *Brachy bacterium*, *Cryobacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Planococcus*, *Carnobacterium*, *Lysobacter* и *Pseudomonas* (Katayama *et al.*, 2007).

В древних толщах вечной мерзлоты в большом количестве были обнаружены денитрификаторы и ацетокластические метаногены (Rivkina *et al.*, 1998). Отложения древней вечной мерзлоты содержат также большое разнообразие метанотрофных бактерий (например, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*), способных окислять и ассимилировать метан при отрицательных температурах (Trotsenko and Khmelenina, 2005). Бактерии родов *Exiguobacterium* и *Psychrobacter* неоднократно выделяли из образцов древней сибирской вечной мерзлоты (Bakermans *et al.*, 2006; Vishnivetskaya *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009). Представители этих родов приспособлены к долгосрочному замораживанию (при – 12°C, когда внутриклеточная вода не замерзает), они растут при отрицательных температурах и проявляют некоторые свойства психрофилов, такие как состав клеточных мембран и льдообразующая активность (Ponder *et al.*, 2005).

Жизнеспособная фракция (<0.1-1%) в различных районах вечной мерзлоты может быть представлена, по крайней мере, 70 родами, с преобладанием грамположительных представителей *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Очень древняя вечная мерзлота содержит повышенное количество *Actinobacteria* (Willerslev *et al.*, 2004); *Gammaproteobacteria*, особенно *Xanthomonadaceae*, доминируют среди *Proteobacteria*, в то время как

представители филума CFB были найдены в незначительном количестве (Steven *et al.*, 2006; Vishnivetskaya *et al.*, 2006; Gilichinsky *et al.*, 2008; Steven *et al.*, 2009). Методами, не связанными с культивированием, было показано доминирование грамположительных бактерий (до 45 и 57% в сибирской вечной мерзлоте и Антарктике, соответственно) и *Gamma*proteobacteria (Gilichinsky *et al.*, 2008; Vishnivetskaya *et al.*, 2006).

Высокогорная мерзлота Китая является местом обитания представителей грамположительных бактерий, с преобладанием рода *Arthrobacter* (Bai *et al.*, 2006). Молекулярный анализ, однако, показал доминирование различных классов протеобактерий (Yang *et al.*, 2008). Многолетнемерзлые отложения Тибетского нагорья, содержащие 10^2 - 10^5 жизнеспособных бактерий на грамм сухого образца, в частности, почти на 90% состояли из грамположительных (с большим доминированием *Actinobacteria*), и только 10% были грамотрицательными представителями *Alphaproteobacteria*. Изоляты были адаптированы к росту при низких температурах и щелочных условиях и выделяли широкий спектр внеклеточных ферментов, таких как протеазы, амилазы и целлюлазы (Zhang *et al.*, 2007).

Эукариоты. Несмотря на то, что эукариоты выделяются из образцов многолетнемерзлых грунтов реже, чем прокариоты, количество биомассы эукариотических организмов в вечной мерзлоте в десятки раз превышает количество биомассы прокариот (Vorobyova *et al.*, 2001). Два новых вида базидиомицетных дрожжей рода *Rhodotorula*, выделенных из вечной мерзлоты, были описаны как *R. creatinovora* и *R. yakutica*, основываясь на изучении 5 изолятов (Golubev, 1998).

Сорок штаммов мицелиальных грибов, представляющих 12 различных таксонов, преимущественно анаморфных *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Geomyces pannorum* var. *pannorum*, *Geomyces vinaceus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium verrucosum*, *Ulocladium botrytis*, *Valsa sordida* и *Verticillium* sp. также были выделены из криопэггов в вечной мерзлоте (Ozerskaya *et al.*, 2004).

Было обнаружено, что жизнеспособные формы дрожжей присутствуют в значительных количествах в грунтах вечной мерзлоты Сибири возрастом около 3 млн. лет (Дмитриев и др., 1997). Выделенные штаммы дрожжей отнесены к трем родам базидиомицетного аффинитета: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, и *Sporobolomyces*. Свойства двух штаммов полностью соответствовали диагнозам видов *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner и *Sporobolomyces roseus* Kluyver et van Niel. Штаммы дрожжей, отнесенные к роду *Rhodotorula*, близки к представителям видов *Rh. muscorum*, и *Rh. mucilaginosa*, но отличались от них по ряду диагностических признаков.

Таким образом, вечная мерзлота является источником выделения широкого разнообразия эубактерий, а также эукариотических организмов.

1.2.2 Изучение микробного разнообразия вечномерзлых грунтов методами молекулярной экологии

Поскольку при культивировании микроорганизмов из таких экстремальных экосистем возникают трудности, то в настоящее время стали широко применяться методы, исключая культивирование. В отличие от исследований активного слоя мерзлых почв, имеется относительно немного исследований микробного разнообразия вечной мерзлоты с применением методов, не включающих культивирование. Изучение филогенетического разнообразия, как современных мерзлых почв, так и многолетнемерзлых отложений, выявили значительное микробное разнообразие. Филогенетический анализ клонированных 16S рРНК последовательностей, выделенных из мерзлых почв и многолетнемерзлых пород, позволил исследователям выявить микроорганизмы, которые были отнесены к родам *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Mycococcus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Chloroflexus*, *Nitrospina*, *Prostheco bacter*, *Flexibacter*, *Hyphomicrobium*, *Azospirillum*, *Blastochloris*, *Methylosinus*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Rhodocyclus*, *Comamonas*, *Rhodoferax*, *Lepthotrix*, *Oxalobacter*, *Xantomonas*, *Methilomonas*, *Desulfuromonas*, *Rhubrobacter*, *Brevibacillus* (Spirina et al., 2003).

Микробное разнообразие образца многолетнемерзлого грунта Канады было также охарактеризовано с использованием различных микробиологических методов (Steven et al., 2007). Культивируемые бактерии, идентифицированные путем секвенирования гена 16S рРНК, принадлежали к филумам *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Большая часть изолятов были психротолерантными штаммами, примерно половина галотолерантными, а три изолята были способны расти при -5°C . Клоновая библиотека бактериальных генов 16S рРНК была представлена 42 филотипами, принадлежащими к филумам *Actinobacteria*, *Firmicutes*, CFB, *Gemmatimonadetes* и *Planctomyces*. Доминировали филотипы, принадлежащие к филумам *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Среди клонированных архейных генов 16S рРНК преобладали последовательности, родственные галофильным археям доменов *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota* (Steven et al., 2004).

Подобное сочетание методов было применено и к изучению микробного разнообразия вечной мерзлоты Сибири возрастом от 5 тыс. до 2-3 млн. лет. Было амплифицировано 265 генов 16S рРНК. Анализ последовательностей выявил их принадлежность к γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, и *Firmicutes*. Частичный сиквенс генов 16S рРНК 49 изолятов аэробных

бактерий показал их принадлежность к порядку *Actinomycetales* (род *Arthrobacter* и семейство *Microbacteriaceae*), *Firmicutes* (*Exiguobacterium* и *Planomicrobium*), *Bacteroidetes* (*Flavobacterium*), γ -*Proteobacteria* (*Psychrobacter*) и λ - *Proteobacteria* (*Sphingomonas*). Две трети изолятов были способны к росту при -2.5°C (Vishnivetskaya *et al.*, 2006).

Для оценки микробного разнообразия ММО недавно стал применяться метагеномный подход (Krivushin *et al.*, 2015; Rivkina *et al.*, 2016). Результаты применения этого метода показали, что наиболее распространены в исследованных образцах девять бактериальных и одна архейная филы: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, и *Verrucomicrobia*. Соотношение представителей перечисленных фил зависело от происхождения образца. Так, в образце озерного осадка (IC4, 32 тыс. лет) 50% обнаруженных последовательностей относилось к *Proteobacteria*. Напротив, в микробном сообществе образца ледового комплекса (IC8) такого же возраста наиболее представлены были *Actinobacteria* (47%), а представительство *Proteobacteria* снизилось до 25%. Среди секвенированных последовательностей были обнаружены также эукариоты и вирусы.

На современном этапе становится возможным определение численности членов микробных сообществ в образце, используя метод количественной или ПЦР «в реальном времени». Так, для учета бактерий рода *Exiguobacterium* в различных образцах вечномерзлых грунтов и тропических почв были разработаны праймеры для амплификации генов *gyrB*, *rpoB* и гипотетического гена, обнаруженного только у этого рода бактерий. При этом было показано, что подход с использованием нескольких праймеров дает более достоверную оценку плотности популяции, чем классический подход с использованием праймеров для гена 16S рРНК. Представители рода *Exiguobacterium* были обнаружены в количестве 50 000 копий генов на 1 мкг тотальной ДНК в 27 из 29 образцов вечномерзлых грунтов, в то время как в тропических почвах - только в одном из четырех (Rodrigues and Tiedje, 2006).

ГЛАВА 2. АДАПТАЦИЯ ПРОКАРИОТ К ЖИЗНИ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

2.1 Психрофильные прокариоты

Обнаружение бактерий на глубине около 3600 м в ледяном покрове над озером Восток, пресного водоема в Антарктиде, вызвало неожиданное оживление в научном сообществе. Однако, обитание микроорганизмов в ледниках, полярных регионах, включающих Антарктику и Арктику, и морозильных камерах - хорошо известное явление. Начало изучения психрофильных микроорганизмов относится к 1887 году, когда Форстер впервые продемонстрировал способность чистых культур расти при 0°C. Его объектом были светящиеся бактерии, выделенные из морской рыбы (Forster, 1887, цит. по Лях, 1976).

В течение последних двух десятилетий выделены и описаны более трех десятков чистых культур бактерий и архей-обитателей низкотемпературных экониш, способных осуществлять метаболизм при температурах ниже 0°C. В нескольких лабораториях во всем мире ведутся исследования биохимической и генетической основы холодовой толерантности микроорганизмов, в том числе с использованием геномных и протеомных исследований.

Согласно наиболее распространенной классификации (Morita, 1975; Баросс и Морита, 1981), психрофильными считаются те бактерии, для которых оптимум температуры не превышает 15°C, а верхний предел роста не превышает 20°C. Психротолерантными (психротрофными, факультативно-психрофильными) считаются бактерии, у которых соответствующие параметры роста не более 25-28 и 35-37°C (табл.4)

Таблица 4. Определения адаптированных к холоду и мезофильных микроорганизмов.

	Температура роста, °C		
	Минимальная	Оптимальная	Максимальная
облигатный психрофил ^a	<0	<15	<20
психротолерант (психротроф) ^b	<7	>20	>25
Типичный мезофил ^a	>10	>25	>35

^a Параметры температур по Morita (1975) ^b Параметры температур по Scherer et al. (2002)

Однако это определение имеет очевидный недостаток. Как правило, микроорганизмы, с одной стороны, ведут себя как термодинамические единицы, и увеличение температуры ведет к увеличению скорости роста. С другой стороны, они также являются биологическими единицами, метаболические этапы, чувствительные к температуре, могут ухудшать функционирование некоторых путей при более высокой температуре (Feller and Gerday,

2003). Хотя скорость роста многих адаптированных к холоду бактерий возрастала с увеличением температуры культивирования от 5 до 25°C, но при этом уменьшалось количество жизнеспособных бактерий, продукция экзоферментов (Feller *et al.*, 1994), синтез белка (De *et al.*, 1997) и проницаемость мембраны (Orange, 1994). Эти факты подчеркивают, что использование единственного параметра – удельной скорости роста для определения оптимальной температуры является не совсем адекватным. Основываясь на этих и других наблюдениях недавно было высказано предложение для всех микроорганизмов, выделенных из холодных мест обитания использовать термин «психрофил» (Cavichioli, 2016). В этой работе в качестве примера автор приводит результаты лабораторного определения T_{opt} и T_{max} для метаногенной археи *Methanococoides burtonii* (23°C и 28°C, соответственно) и для *Methanogenium frigidum* (15°C и 18°C, соответственно), выделенных из антарктического озера. Если считать, что T_{opt} и T_{max} являются полезной мерой адаптации к холоду, то *M. frigidum* будет лучше адаптирован к низкой температуре. Однако, при естественной температуре озера *M. burtonii* растет быстрее, чем *M. frigidum*, поэтому эти температурные показатели только вводят в заблуждение. С экологической точки зрения этот вопрос выглядит еще более сложным. Как известно, что оба метаногена были выделены из оз. Асе (Антарктида), и каждый из них использует различные источники энергии (метилированные C_1 -соединения vs смесь H_2 и CO_2). Очевидно, что при определении субстратного ряда должны учитываться разные факторы и концентрация субстрата это только один из них. Оказывается, несмотря на то, что вода оз. Асе содержит очень много метана, метагеномный анализ показал, что метаногены имеют очень небольшое представительство среди микроорганизмов - обитателей этого озера (Lauro *et al.*, 2011).

Другими авторами предлагается использовать термины «эвритермный» и «стенотермный» для организмов, которые способны расти в широком и узком диапазоне температур соответственно. Согласно этой классификации, истинные или облигатные психрофилы могут рассматриваться как стенотермные, а психротрофные или психротолерантные - как эвритермные (Feller and Gerday, 2003).

2.2 Кинетика роста при низких температурах

Изменения удельной скорости роста в зависимости от температуры описываются уравнением Аррениуса:

$$K=A \exp(-\mu/RT),$$

где K – удельная скорость роста, A - фактор частоты, μ - температурный коэффициент, R - универсальная газовая постоянная, T - абсолютная температура. Графики

Аррениуса большинства бактерий характеризуются линейностью в области 20°C, которая называется нормальным диапазоном или диапазоном Аррениуса. Отклонения от прямой выше или ниже диапазона Аррениуса отражают неспособность бактерий достигнуть максимальной скорости роста.

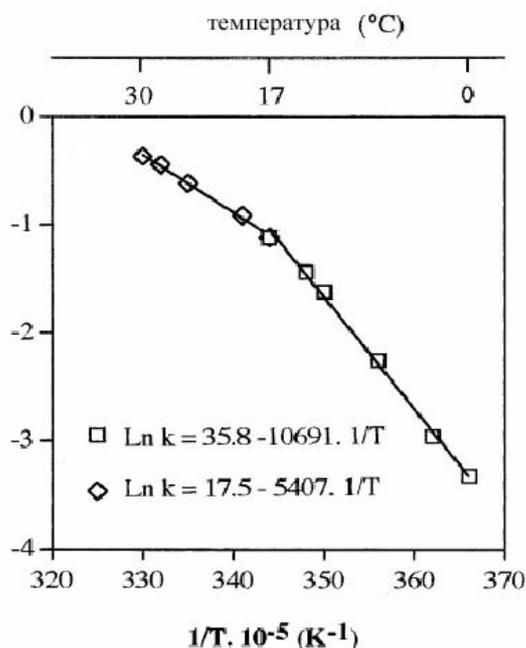


Рис. 3. График Аррениуса для скорости роста *Pseudomonas fluorescens* (Guellou and Guespin-Michel, 1996).

Как правило, при исследовании зависимости скорости роста от температуры, график Аррениуса при температурах ниже оптимальной имеет вид ломаной кривой с двумя линейными участками (рис. 3.). Точку излома называют критической температурой ($T_{\text{крит}}$). О существовании критической температуры сообщалось для психротрофных, мезофильных и термофильных бактерий (Harder and Veldkamp, 1968; Mohr and Krawiec, 1980; Berger et al, 1996; Guillou and Guespin-Michel, 1996; Isaksen and Jorgensen, 1996; Thammavongs et al., 1996; Farewell and Neidhardt, 1998; Choma et al, 2000; Tarpgaard et al., 2005). Отсутствие сообщений о наличии критической температуры для строго психрофильных бактерий, скорее всего, говорит об отсутствии систематических исследований данной группы бактерий при температурах, значительно ниже оптимальных. Бакерман и Нельсоном (2004) были сделаны предположения о том, что критическая температура существует как результат возросших энергетических потребностей, синтеза стрессовых белков и/или использования альтернативных метаболических путей при низких температурах (Farrell and Rose, 1967; Guillou and Guespin-Michel, 1996; Choma et al., 2000). Для выяснения причины существования критической температуры Бакерманс и Нельсон (Bakermans and Nealson,

2004) исследовали зависимость скорости роста, синтеза белка, ДНК и РНК от температуры у психротрофной бактерии *Psychrobacter* sp. K5 и показали, что график Аррениуса для скорости синтеза ДНК был подобен таковому для скорости роста с изломом в точке $T_{\text{крит}}$. Графики же синтеза РНК и белка не имели $T_{\text{крит}}$. Этот факт, по мнению авторов, указывает на то, что рибосомы и РНК-полимераза остаются в функциональном состоянии при температуре ниже критической, что было продемонстрировано ранее для других психротрофных и психрофильных бактерий (Saguyama and Sasaki, 1980). Для некоторых мезофилов, наоборот, было показано изменение скорости синтеза белка при критической температуре, отражающее неспособность мезофильных рибосом функционировать при низкой температуре (Cloutier et al., 1992; Farewell and Neidhardt, 1998).

Подобные работы тесно связаны с изучением экономического коэффициента (отношения образованной биомассы к количеству потребленного субстрата) при различных температурах. При этом исследователи исходили из того, что для конкурентоспособности в холодных местообитаниях организм должен чем-то компенсировать низкую скорость роста. *Psychrobacter* sp. K5, выделенный из криопэга в вечной мерзлоте Сибири и позже описанный в качестве нового вида *P. cryohalolentis* (Bakermans et al., 2006), имел максимальную величину экономического коэффициента при температурах 0-4 °С, которые близки к критической (4°С). Ниже нуля эта величина резко падала (Bakermans and Nealson, 2004). Известно также несколько работ по исследованию данного параметра у СВБ из холодных местообитаний. Так, у двух психротолерантных штаммов *Desulfovibrio*, описанных Зассом (Sass et al., 1998), максимальный экономический коэффициент был при температурах, ниже оптимальной. Экономический коэффициент психротолерантной бактерии *Desulforhopalus vacuolatus* не менялся при температурах культивирования от 10 до 0°С, а при оптимальной снижался (Isaksen and Jorgensen, 1996). Психротолерантные и психрофильные сульфатредукторы *Desulfofaba gelida*, *Desulfofaba oceanense*, *Desulfofrigus fragile*, *Desulfotalea artica* и *Desulfotalea psychrophila* имели почти постоянную величину урожая в диапазоне температур от 0°С до оптимальной температуры или максимальную около нуля (Knoblauch and Jorgensen, 1999). Для *Desulfovibrio psychrotolerans* (оптимальная температура 20°С) максимальный экономический коэффициент наблюдался при температурах от 5 до 15°С (Targgaard et al., 2005). Таким образом, перечисленные СВБ имели максимальный экономический коэффициент при температурах, более близких к температурам *in situ*, чем к оптимальным температурам. Из этого авторы статьи заключили, что при оценке адаптации к температуре нужно учитывать именно этот показатель, а не скорость роста. Для сравнения, у мезофилов обычно экономический коэффициент максимален при оптимальной температуре

(Isaksen and Jorgensen, 1996; Ma and Marquis, 1997; Adamberg *et al.*, 2003; Bakermans and Neelson, 2004).

2.3 Холодовой шок психрофильных и психротолерантных бактерий

Холодовой шок у *B. subtilis* и *E. coli* симулируют охлаждением клеток до 15°C. Подобный ответ можно вызвать и у адаптированных к холоду бактерий, только действием гораздо более низких температур. При этом возникает вопрос: существуют ли какие-либо особые механизмы ответа на холодовой шок, позволяющие этим бактериям справляться с действием более низких температур?

К настоящему времени имеются некоторые данные, указывающие на то, что в ответе на холодовой шок у адаптированных к холоду бактерий существуют как сходства, так и отличия от мезофильных.

Сразу после холодового шока у некоторых психроактивных бактерий – *Listeria monocytogenes* (Bayles *et al.*, 1996), *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1996), *Pseudomonas fragii* (Michel *et al.*, 1996), наступала лаг-фаза, так же, как у *E. coli*. Однако, например, у *Vibrio* sp., также как и у некоторых мезофильных бактерий, лаг-фазы не наблюдалось. По-видимому, время, которое требуется на то, чтобы клетка адаптировалась к новой температуре, не зависит от температурного диапазона роста данной бактерии (Hebraud and Portier, 1999).

Синтез большинства цитозольных белков, продуктов так называемых “housekeeping” генов мезофильных бактерий, ингибируется после холодового шока. Это показано как для *B. subtilis*, так и для *E. coli*. У *L. monocytogenes*, *A. globiformis*, *Ps. fragii* этого не происходило. Было высказано предположение, что у холодоустойчивых бактерий даже при оптимальной температуре существуют некие факторы, позволяющие после холодового шока поддерживать трансляционный аппарат в функциональном состоянии (Hebraud and Portier, 1999).

Общим свойством изученных адаптированных к холоду бактерий является то, что степень индукции индуцибельных белков у них значительно ниже, чем у мезофильных (Gumley and Innis, 1996; Michel *et al.*, 1997; Backermans *et al.*, 2006).

У адаптированных к холоду бактерий *Arthrobacter* sp. (Ray *et al.*, 1994., Berger *et al.*, 1996), *Pseudomonas* sp. (Hebraud *et al.*, 1994, Michel *et al.*, 1997), *Micrococcus roseus* (Ray *et al.*, 1994), *Pseudoalteromonas fragii* (Medigue *et al.*, 2005), *D. psychrophila* (Rabus *et al.*, 2004), *Methanogenium frigidum* и *Methanococcoides burtonii* (Saunders *et al.*, 2006) были идентифицированы гены белков холодового шока. Количество этих генов варьирует у разных бактерий. Так, у *A. globiformis* SI 55 всего один ген (Berger *et al.*, 1997), у *Ps. fragii* их

четыре (Hebraud *et al.*, 1994), у *B. cereus* WSBC 10201 – шесть (Mayr *et al.*, 1996), у *D. psychrophila* – девять (Rabus *et al.*, 2004). Единственный ген *A. globiformis* SI 55 и все 4 у *Ps. fragii* являются холодоиндуцибельными. У *B. cereus* только один из шести является холодоиндуцибельным. Особенных отличий в структуре этих белков обнаружено не было. Так же, как у *B. subtilis*, у которой мутации по всем генам белков холодового шока являются летальными, у *A. globiformis* SI 55 мутация, выключающая ген *cspA*, летальна. Это говорит о том, что функция белков холодового шока у психроактивных бактерий не ограничивается только адаптацией к низкой температуре (Hebraud and Portier, 1999).

2.4 Роль компонентов клетки при адаптации к низкой температуре

2.4.1 Адаптация мембраны прокариотической клетки к низкой температуре

Мембрана является динамичной структурой клетки, выполняющей ряд важных функций: поглощение питательных веществ, дыхание, фотосинтез, синтез АТФ и многие другие. Основу мембраны составляет липидный бислой (за исключением некоторых термофильных архей с монослойной мембраной), который в функциональном состоянии находится в жидко-кристаллической фазе. Снижение температуры приводит к переходу в фазу геля, что сопровождается уменьшением активности мембрансвязанных ферментов, снижением скорости латеральной диффузии периферических и образованием кластеров интегральных белков мембраны (Hazel, 1995). Температура, при которой совершается фазовый переход, зависит от нескольких факторов, важнейшим из которых является состав жирных кислот липидов.

Многие прокариоты обладают свойством изменять состав жирных кислот липидов таким образом, что мембрана при меняющейся температуре окружающей среды сохраняет одну и ту же вязкость. Эта способность называется гомовискозной адаптацией (Becker *et al.*, 1996).

Состав жирных кислот липидов влияет на плотность их упаковки, от которого, в свою очередь, зависит температура фазового перехода. Чем плотность упаковки выше, тем выше температура фазового перехода, и наоборот. Поэтому при адаптации к холоду имеют значение изменения жирнокислотного состава, которые направлены на снижение плотности упаковки «хвостов» фосфолипидов в бислое мембран. Таких механизмов известно несколько. Это **введение двойной связи, укорочение, разветвление цепи** жирной кислоты, а также изменение соотношений жирных кислот с **цис- и транс-конформацией двойной связи, изо-и антеизо-разветвлением**. Введение двойной связи происходит посредством модификации уже существующих жирных кислот липидов при активации фермента десатуразы. Появление в мембране жирных кислот с укороченной и разветвленной цепью

связано с их синтезом *de novo* и последующей интеграцией в мембрану (Gounot and Russel, 1999).

Изменение соотношения жирных кислот с короткой и длинной цепью. Длинноцепочечные жирные кислоты способны пронизывать бислои мембраны, усиливая ее ригидность. Жирные кислоты с короткой цепью, особенно те, которые имеют менее 12 атомов углерода в цепи, неспособны пронизывать бислои и образовывать гидрофобные связи с другими белками и липидами (Chintalapati *et al.*, 2004). Таким образом, они способствуют поддержанию текучего состояния мембраны.

Кислоты с прямой и разветвленной цепью. Известно, что как структурные, так и геометрические изомеры жирных кислот влияют на текучесть мембраны. Разветвленные жирные кислоты увеличивают текучесть мембраны по сравнению с жирными кислотами с прямой цепью. Наиболее распространенным является наличие метильной группы у первого атома углерода (изо-разветвление) или у второго (антеизо-разветвление). Оба типа разветвления увеличивают текучесть мембраны по сравнению с прямой цепью, но больший эффект в этом отношении дает антеизо-разветвление. Для *B. subtilis* (Suutari and Laakso, 1992), *Flavobacterium thermophilum* (Oshima and Miyagawa, 1974), *Bacillus* sp. T1 (Chan *et al.*, 1973), *A. chlorophenicus* (Unell *et al.*, 2007) было показано увеличение содержания антеизо-разветвленных жирных кислот мембраны при одновременном снижении доли изо-разветвленных.

Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Липиды, в состав которых входят только насыщенные жирные кислоты, «упакованы» в бислое очень плотно, в то время как изгиб в ацильной цепи, обусловленный наличием двойной связи, мешает плотной «упаковке». Поэтому точка перехода мембраны в фазу геля снижается. Чем больше двойных связей, тем ниже эта точка. Рис. 4 иллюстрирует зависимость температуры фазового перехода жирных кислот C₁₈ от количества двойных связей (Becker *et al.*, 1996).

Конверсия насыщенных жирных кислот в ненасыщенные является самым распространенным среди бактерий способом поддержания жидкокристаллического состояния мембраны при снижении температуры.

Достаточно хорошо изученным микроорганизмом в отношении состава жирных кислот липидов является бактерия *L. monocytogenes*, вызывающая пищевые отравления и способная развиваться в холодильнике. Было показано, что клетки, выросшие при 10°C, имели повышенное содержание *антеизо*-C_{15:0} (12-метилтетрадекановой) кислоты и короткоцепочечных жирных кислот, по сравнению с клетками, выросшими при 30°C (Jones *et al.*, 1997). Мутанты, дефектные по этой жирной кислоте, не были способны к росту при

низкой температуре, а их мембраны отличались от мембран, полученных из клеток дикого типа, значительно меньшей текучестью. Из этого авторы сделали вывод о том, что *антеизо*-C_{15:0} жирная кислота наделяет мембрану свойством повышенной текучести, что обеспечивает возможность роста при температуре холодильника (Annous *et al.*, 1997; Edgcomb *et al.*, 2000).

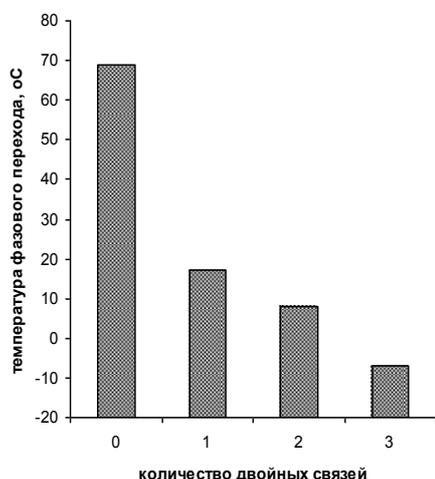


Рис. 4. Зависимость температуры фазового перехода жирных кислот C₁₈ от количества двойных связей (Becker *et al.*, 1996).

Сообщалось о влиянии температуры культивирования на жирнокислотный состав мембран четырех психрофильных штаммов *Vibrio* spp. У двух из них при температуре ниже оптимальной происходило увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот C_{15:1}, C_{16:1} и C_{17:1}, в то время как у третьего увеличивалось количество короткоцепочечных жирных кислот. Четвертый штамм уже при оптимальной температуре содержал около 60% гексадеценовой кислоты, и температура культивирования почти не влияла на состав жирных кислот его клеточных стенок (Bhakoo and Herbert, 1979).

Для клеток психрофильной метаногенной археи *M. burtonii*, выращенных при 4°C, было показано увеличение доли липидов, содержащих ненасыщенные связи, по сравнению с клетками, выращенными при 23°C (Nichols *et al.*, 2004).

Клеточные стенки изолятов из вечномёрзлых грунтов Сибири *Exiguobacterium* sp. 255-15 и *Psychrobacter* sp. 273-4 характеризовались увеличением степени насыщения и укорочением длины цепи жирных кислот при снижении температуры культивирования (Ponder *et al.*, 2004).

Таким образом, исходя из вышеописанных литературных данных, можно заключить, что для изученных психрофильных бактерий характерны те же самые закономерности

изменения состава жирных кислот мембран в ответ на изменение температуры культивирования, что и для мезофильных.

Состав полярных групп липидов. Размер и заряд полярных групп липидов также может влиять на плотность упаковки глицерофосфолипидов и, таким образом, на текучесть мембраны. В литературе имеются единичные работы, показывающие, что в ответ на снижение температуры культивирования происходят изменения в составе полярных групп липидов. Эти изменения также направлены на снижение плотности упаковки компонентов мембраны, что было показано для *Bacillus caldotenax* (Hasegawa *et al.*, 1980).

Состав белков мембраны. Белки, взаимодействуя с липидами в составе мембраны, также вносят свой вклад в ее стабильность (Kropinsky *et al.*, 1987). Для *E. coli* было показано, что липиды мембраны теряют свободу вращения при взаимодействии с белками (Takeuchi *et al.*, 1978). Кроме того, было высказано предположение, что определенные белки теплового шока изменяют текучесть мембраны, взаимодействуя с липидами и мембранными белками (Sato *et al.*, 1997).

Состав каротиноидов. Большое количество видов бактерий, водорослей и растений содержат каротиноиды. Исследования *in vitro* показали, что каротиноидные пигменты взаимодействуют с мембраной клетки и увеличивают ее жесткость (Jagannadham *et al.*, 1991; Jagannadham *et al.*, 1996; Chattopadhyay *et al.*, 1997; Jagannadham *et al.*, 2000). При изучении антарктических бактерий было замечено, что многие из них содержат в мембране пигменты каротиноидной природы. Это натолкнуло исследователей на мысль об их возможной роли в поддержании текучести мембраны. Так, для антарктических изолятов *Sphingobacterium antarcticus* и *Micrococcus roseus* было показано, что соотношение различных каротиноидов мембраны зависит от температуры культивирования: при низкой температуре возрастало содержание полярных каротиноидов с одновременным уменьшением неполярных (Jagannadham *et al.*, 1991; Chattopadhyay *et al.*, 1997).

2.4.2 Холодоактивные ферменты

Одной из главных проблем, с которой сталкиваются микроорганизмы в холодных местах обитания, является поддержание скорости ферментативных реакций на должном уровне. Это достигается за счет так называемых холодоактивных ферментов, способных осуществлять катализ при низких температурах (Feller and Gerday, 2003).

К настоящему времени выделено и охарактеризовано большое число ферментов психрофильных и психротрофных микроорганизмов. Известно, что реакции, катализируемые ими, характеризуются меньшими значениями энергии активации (ΔG). Еще более важным является то, что такие реакции происходят с небольшим изменением энтальпии (ΔH), что

показывает меньшую зависимость активности холодоактивных ферментов от температуры. Это достигается за счет того, что при активации разрывается меньше взаимодействий, зависящих от энтальпии (Somero, 1995; Lonhienne *et al.*, 2000). Поскольку эти взаимодействия вносят существенный вклад в конформацию активного центра, из этого следует, что активный центр холодоактивных ферментов должен быть менее стабильным и, как следствие, более термолabileм, чем у мезофильных ферментов. Действительно, характерной чертой холодоактивных ферментов является то, что константа скорости их инактивации на несколько порядков выше, чем у мезофильных гомологов. Кроме того, психрофильные ферменты инактивируются при температурах, которые намного ниже, чем температура их денатурации, что также указывает на наличие нестабильного активного центра или промежуточных продуктов катализа (D'Amico *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2003). Этот факт иллюстрирует основную мысль в концепции активности психрофильных ферментов: локализованное увеличение пластичности молекулы в каталитическом центре ответственно за высокую, но термочувствительную активность (Fields and Somero, 1998).

Кроме того, рентгеноструктурный анализ выявил, что каталитическая щель холодоактивных ферментов больше, чем мезофильных. Это увеличивает доступность субстрата, а также облегчает выход продуктов реакции (Russell *et al.*, 1998; Aghajari *et al.*, 2003).

Анализ структурных факторов, которые ответственны за стабильность белковой молекулы, показал, что все стабилизирующие взаимодействия в молекулах холодоактивных ферментов уменьшены по силе и количеству. Так, редуцировано количество аргининовых и пролиновых остатков, которые ограничивают вращение и могут образовывать водородные связи и солевые мостики, в то время как распространены кластеры остатков глицина, обеспечивающие локальную подвижность цепи. Редуцированы все виды слабых взаимодействий (ионные, гидрофобные взаимодействия, водородные связи). Неполярные коровые кластеры имеют меньшую гидрофобность, что делает внутреннюю часть белка менее компактной. В мультимерных ферментах ослаблена когезия между мономерами за счет уменьшения количества и силы взаимодействий, участвующих в ассоциации мономеров. Нужно отметить, однако, что каждое семейство белков имеет свою собственную стратегию уменьшения стабильности молекулы, используя один или комбинацию перечисленных выше механизмов (Leiros *et al.*, 1999; Gianese *et al.*, 2001, 2002; Bell, 2002).

2.4.3 Антифризные белки бактерий

Птицы, рыбы, амфибии, насекомые и растения используют несколько стратегий для того, чтобы справиться с экстремально низкой температурой в их естественной среде обитания.

Механизмы, обеспечивающие их адаптацию, дают ценные подсказки для исследования бактериальной устойчивости к холоду. Одной из основных стратегий морозостойких животных и растений является образование определенных белков, которые препятствуют замерзанию жидкости в их организмах при отрицательных температурах. Их общее название лед-связывающие белки (Ice-Binding Protein, IBP), частным случаем которых являются антифризные белки (antifreeze proteins, AFPs). Возможно также применение и других терминов, таких как антифризные гликопротеины, антифризные полипептиды для обозначения структурных особенностей этих криопротекторов.

Известно, что растворенные в воде вещества вызывают увеличение температуры кипения раствора и депрессии в его замерзании. Таким образом, из-за хлорида натрия и других солей в ее составе морская вода в холодных регионах замерзает не при 0°C, а при -1.9°C. Чтобы противостоять замораживанию, кровь рыб, обитающих в таких суровых условиях должна иметь температуру замерзания ниже этой температуры. Тем не менее, низкий молекулярный вес растворенных веществ в крови рыбы не могли бы объяснить депрессию от замерзания более чем на 1.4°C. Причиной дальнейшего снижения точки замерзания на 0.5°C и более, могли стать образующиеся AFPs. Впервые наличие некоторых высокомолекулярных антифризных соединений в крови некоторых рыб Арктики было обнаружено Шоландером и его сотрудниками (Scholander *et al.*, 1957). Дальнейшие исследования Артура Девриза и его соавторов (DeVries and Wohlschlag, 1969) показали, что эти антифризные соединения имеют белковую природу. К настоящему времени стало очевидно, что AFPs, выделенные из различных источников, значительно различаются по своей структуре и активности (Bar Dolev *et al.*, 2016). Согласно современным представлениям, известные AFPs по эффективности действия можно разделить на три группы:

1. “Очень слабые” AFPs, основная функция которых заключается в ингибировании рекристаллизации, вследствие их чрезвычайно слабой термогистерезисной активности. К представителям этой группы относится белок паслёна горько-сладкого *Solanum dulcamara* (Huang and Duman, 2002), AFP из многолетнего плевела *Lolium perenne* (Pudney *et al.*, 2003).
2. Умеренно активные AFPs. К этой группе относится большинство известных AFPs I–III типов и антифризные гликопротеиды рыб, бактерий и т.д. Подробная характеристика представителей этой многочисленной группы представлена в обзоре, посвященном распространению антифризных белков в природе (Гулевский, Релина, 2009).
3. Гиперактивные AFPs, к которым относят AFP камбалы, некоторые AFPs бактерий и насекомых.

Антарктические морские диатомовые водоросли также продуцируют во внешнюю среду соединения, способные связываться со льдом (Raymond and Knight, 2003). Эти соединения ингибируют перекристаллизацию, а при замораживании “вмерзают” в решетку льда. У 3-х видов снежной плесени *Coprinus psychromorbidus*, *Myriosclerotinia borealis* и *Typhula incarnata* обнаружен небольшой белок, гомологичный AFP камбалы (Newsted *et al.*, 1994; Hoshino *et al.*, 2003a,b; Xiao *et al.*, 2010). Он обладает антифризной активностью и способен связываться с мембранами. Возможно, он имеет дополнительную защитную функцию по отношению к мембранам, помимо антифризной, что предполагает наличие механизма взаимодействия с мембранами, отличного от механизма связывания с зародышевыми кристаллами льда.

Депрессия точки замерзания, вызванная присутствием AFPs, является неколлиативной по своей природе. Хотя температура точки замерзания снижается, температура плавления существенно не изменяется. Разница между точками замерзания и плавления, так называемый температурный гистерезис (ТН), является мерой антифризной активности. Этот механизм известен как механизм предотвращения замерзания. Согласно адсорбционному механизму торможения, предложенному Раймондом и Девризом (Raymond and DeVries, 1977), происходит адсорбция белковых молекул на поверхности кристалла льда, что исключает рост кристаллов в этом направлении.

Помимо возникновения ТН, действует и другой механизм действия AFPs, так называемая устойчивость к замерзанию. При замораживании формирование льда происходит в виде поликристаллической массы. Рост крупных кристаллов происходит за счет маленьких кристаллов, что называется рекристаллизацией. AFPs ограничивают рост кристаллов при минусовых температурах адсорбируясь на поверхности льда. Этот механизм называется торможением рекристаллизации.

В дополнение к снижению температуры замерзания жидкостей организма и предотвращения ущерба от рекристаллизации льда, в некоторых случаях AFPs используются для защиты клеточных мембран путем ингибирования термотропных фазовых переходов с помощью блокирования ионных каналов. Таким образом, целый ряд факторов определяет криопротекторный потенциал AFPs.

Эволюционные исследования AFPs пока не дали однозначного ответа, и результаты этих исследований являются предметом дискуссий. Наличие AFPs считается более прогрессивным признаком по сравнению с накоплением осмолитов таких, как полиолы и сахара, хотя не все исследователи согласны с этим утверждением (Pullin, 1993). Однако AFPs из представителей далеких друг от друга систематических таксонов не обнаруживают

гомологии и имеют различную третичную структуру (Barrett, 2001). Эта группа белков – прекрасный пример параллельной и конвергентной эволюции на молекулярном уровне.

Предположительно, гидрофильные AFPs насекомых произошли от белков, ответственных за удержание воды в организме при засухе в жарких регионах, где обитали предки холодоустойчивых видов (Shneppenheim and Theede, 1980; Buckland, 1981).

Существует мнение, что ген AFPs нототениевых рыб произошел от гена панкреатического трипсиногена (Chen *et al.*, 1997). В первичный ген AFPs вошли 5'-конец древнего гена трипсиногена, который обеспечивает секреторный сигнал, и 3'-нетранслируемая область. Впоследствии элемент, кодирующий Thr-Ala-Ala гена-предка, амплифицировался, что обусловило появление новой функции белка. Именно эти повторы ответственны за 4–7% дивергенции между генами AFP и трипсиногена. Арктические и антарктические виды рыб содержат практически идентичные компоненты гликопротеинов (Osuga and Feeney, 1978). В то же время ген AFP арктической трески *Dissostichus mawsoni* не гомологичен гену трипсиногена (Liu *et al.*, 2007). Гены AFPs нототениевых и тресковых имеют разную интронэкзонную организацию и различные спейсерные последовательности, что является причиной различного процессинга белков-предшественников. Последовательности, кодирующие повторы Thr-Ala/Pro-Ala, также отличаются. Вышеприведенные факты свидетельствуют о независимом происхождении представителей AFPs в разных таксонах рыб и последующей конвергентной эволюции. Филогенетический анализ показывает, что все AFPs II (Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} -независимые) произошли от общего предка (возможно, лектина) и позже развили различные механизмы связывания со льдом (Chen *et al.*, 1997). Вероятно, связывающийся со льдом домен AFP II развился в ходе молекулярной эволюции из углеводсвязывающего сайта лектиноподобного предка (Ewart *et al.*, 1998). AFP III рыб гомологичен C-концевому участку синтазы сиаловой кислоты млекопитающих (Horwath and Duman, 1983). Гомология особенно сильно выражена в районе плоской поверхности, связывающейся со льдом. На основании этих данных можно дополнить список возможных “родственников” AFPs из белков, взаимодействующих с сахарами и полисахаридами. Один из генов AFPs III бельдюги *Lycodichthys dearborni* кодирует 12 tandemных повторов, каждый из которых транслируется в 7 кДа молекулу AFP III (Yu *et al.*, 2005). Организация этого гена аналогична организации генов AFPs. Сходная структура генов этих совершенно различных полипептидов свидетельствует о наличии у рыб общего механизма организации участков геномов, отвечающих за приспособление к низким экстремальным условиям полярных ареалов.

АFPs растений выполняют и вторую функцию защиты от психрофильных патогенов (Yaish *et al.*, 2006). Остается открытым вопрос, какая из функций является первичной в эволюционном плане. АFP с низкой термогистерезисной активностью *S. dulcamara* (Huang and Duman, 2002) сходен с транскрипционными факторами растений, регулирующими экспрессию белков, связанных с патогенезом, что также дополняет список АFPs с возможной двойной функцией.

Таким образом, вероятно, несколько очень разных белков независимо друг от друга эволюционировали до общей функции, чтобы сформировать АFPs, не смотря на отсутствие сходства генетических последовательностей. В связи с тем, что в последовательностях, кодирующих АFPs, отсутствует консервативный мотив, ПЦР-зависимые молекулярно-экологические исследования в настоящее время невозможны (Yu and Lu, 2011).

Впервые присутствие белка, приводящего к ТН в бактериях, была продемонстрирована Думаном и Олсеном (Duman and Olsen, 1993), а штамм *Moraxella* sp. стал первым продуцентом АFP (Yamashita *et al.*, 2002). С тех пор антифризная активность была обнаружена в целом ряде бактерий, значительная часть которых представляет собой антарктические изоляты, что прямо указывает на роль АFPs в холодной адаптации бактерий. Были клонированы и охарактеризованы антифризные белки из клеток представителей *Flavobacteriaceae* (Raymond *et al.*, 2008), *Colwellia* (Raymond *et al.*, 2007), *Marinomonas primoryensis* (Gilbert *et al.*, 2005) и *Pseudomonas putida* (Xu *et al.*, 1998, Kawahara *et al.*, 2001). Антифризные белки также были обнаружены в *Flavobacterium xanthum* (Kawahara *et al.*, 2007), *Chryseobacterium* (Walker *et al.*, 2006), *Micrococcus cryophilus* (Duman and Olsen, 1993) и *Rhodococcus erythropolis* (Duman and Olsen, 1993). Среди исследованных культивируемых бактерий из антарктических озер только 19 из 866 штаммов (2.1%) обладали антифризной активностью, причем из 19 изолятов 18 принадлежало к γ -протеобактериям и только 1 - к α -протеобактериям (Gilbert *et al.*, 2004).

В начале исследований антифризного феномена самые высокие значения ТН были обнаружены у насекомых (3-6°C) и рыб (0.7-1.5°C). АFPs, выделенные из растений и микроорганизмов создавали значительно меньший ТН: растительные от 0.2 до 0.5°C, бактериальные – менее чем 0.1°C. Это позволяло утверждать, что у животных осуществляется механизм предотвращения замерзания, в то время как стратегия растений и микроорганизмов заключается в устойчивости к замерзанию.

Впоследствии эти существовавшие представления нарушили два сообщения. АFP с высокой активностью был обнаружен у антарктической бактерии *Marinomonas primoryensis* (Gilbert *et al.*, 2005). Для проявления антифризной активности этому белку необходим Ca^{2+} ;

активность его имеет кооперативный характер. Он способен снижать температуру замерзания на 2°C в концентрации 0.5 мг/мл и, следовательно, его можно отнести к гиперактивным AFPs. Однако в отличие от классических AFPs не существует доказательств связывания данного белка с поверхностью кристаллов льда в термогистерезисном промежутке. Он необычайно велик – более 1 МДа. Предложенная модель третичной структуры этого белка предполагает β -спираль, одна сторона которой связывает ионы Ca^{2+} , расположенные в один ряд, а другая – содержит гидрофобные остатки аминокислот (Garnham *et al.*, 2008). Рядом с Ca^{2+} -связывающим участком находится связывающаяся со льдом поверхность, которая состоит из параллельных повторов остатков треонина и аспарагина. Следует отметить, что это первый из бактериальных AFPs, охарактеризованный достаточно детально, и один из пяти гиперактивных AFPs, идентифицированных на данный момент.

Во внутриклеточном пространстве антарктической бактерии *Flavobacterium xanthum* IAM12026 был также выявлен белок с термогистерезисной и антирекристаллизационной активностью, имеющий молекулярную массу 59 кДа (Kawahara *et al.*, 2001). Антарктическая морская бактерия *Colwellia* продуцирует внеклеточный белок с молекулярной массой 25 кДа, который обнаруживает сродство к кристаллам льда. Данный белок состоит из 253 аминокислотных остатков, его первичная структура гомологична аналогичным белкам из снежной плесени и диатомовых водорослей (Raymond and Knight, 2003; Raymond *et al.*, 2007). Функция этого белка во внеклеточном пространстве не известна, однако предполагают, что он может быть ингибитором рекристаллизации, защищая мембраны бактерий в замороженном состоянии. Кроме того, у ризобактерии *Pseudomonas putida* был идентифицирован ген, который кодирует необычный белок, проявляющий нуклеирующую и антифризную активность (Miyuoi *et al.*, 2004). Этот необычный белок не исследован и не имеет своего места в классификации белков, контролирующих рост кристаллов льда.

Биотехнологические аспекты AFPs постоянно обсуждаются, и пополняется список их возможного применения (Cheung *et al.*, 2017). Бактериальные AFPs могут оказаться полезными в криохирургии, а также в криоконсервации организмов, органов, клеточных линий и тканей. Исследования последних 10 лет показали, что AFPs могут проявлять как защитное, так и цитотоксическое действие на жизнеспособность клеток и термодинамические свойства сред и растворов во время низкотемпературного хранения. Показано, что AFPs рыб стабилизируют мембраны и клетки *in vitro* во время гипотермического хранения (Tomczak *et al.*, 2002), хотя механизм этой стабилизации пока не выяснен. Способность AFPs типов I, II, III сохранять целостность мембран при

гипотермическом хранении была исследована на липосомах (Pullin, 1993). Трансгенные сорта риса, в которых удалось осуществить избыточную экспрессию AFPs, способны выдерживать промерзание при -1°C в течение 24 ч и затем оттаивать без существенных повреждений (Zhang *et al.*, 2007). Кроме того, эти растения более устойчивы к инфекциям. Созданы трансгенные растения, экспрессирующие AFPs насекомых (Huang *et al.*, 2002). Хотя трансгенные линии резушника *Arabidopsis* замерзают при более низких температурах, их выживаемость не отличается от выживаемости дикого типа. Экспрессия AFP I из бронзового керчака *Myoxocephalus aeneus* в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* повышает их устойчивость к замораживанию и усиливает способность к газопродукции не только самих дрожжей, но и замороженного сдобного теста, содержащего трансгенные линии (Panadero *et al.*, 2005). Предпринята попытка использования AFPs типов I и III в протоколе хранения сердца при -1.3°C (Amir *et al.*, 2004). При хранении сердца без AFP происходила кристаллизация, тогда как в присутствии AFP орган не замерзал и имел лучшие показатели деятельности (скорость сокращения, коронарный ток и давление), чем в контроле.

В пищевой промышленности AFPs могут быть использованы для улучшения качества замороженных продуктов. Так, добавление в мороженое экстрактов пшеницы, содержащих AFPs, позволяло добиться более однородной консистенции мороженого, которое подвергалось нагреву в процессе хранения (Regand and Goff, 2006). Замороженное тесто при добавлении 15.4 % AFPs *D. carota* имеет более равномерную текстуру, так как в нем уменьшается количество замерзающей во время хранения воды (Zhang *et al.*, 2007). Несмотря на возрастающий интерес к коммерческому использованию AFPs, который подтверждается патентами на получение и применение антифризных белков, этот потенциал в настоящее время используется недостаточно, а использование бактериальных AFPs ограничивается отсутствием сведений об их свойствах (Venketesh and Dayananda, 2008; Wilson and Walker, 2010; Cheung *et al.*, 2017).

2.5 Геномы психрофильных прокариот

К настоящему моменту секвенированы и проанализированы немногим более 100 психрофильных прокариот, такое же количество находится в процессе сборки и аннотирования (De Maayer *et al.*, 2014).

Это является большим достижением, поскольку их сравнение с близкородственными мезофильными и термофильными видами способствует пониманию эволюции холодовой адаптации (Margensin *et al.*, 2006). В таблице 4 приведены сведения о некоторых секвенированных геномах адаптированных к холоду прокариот. Среди перечисленных

прокариот две бактерии выделены из вечной мерзлоты Арктики - *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T и *P. arcticus* 273-3^T (Ayala-del-Río *et al.*, 2010).

Таблица 5. Геномы психрофильных и психроактивных прокариот.

Микроорганизм	Размер генома, Мб	Количество во белков	Г+Ц, %	Ссылка
<i>Colwellia psychrerythrea</i>	5.26	4441	38.0	Methe <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	4.45	3674	40.0	Medigue <i>et al.</i> , 2005
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	3.65	3128	46.6	Rabus <i>et al.</i> , 2004
<i>Psychrobacter glacincola</i>	3.49	2861	42.8	NZ_LIQB00000000.1
<i>Psychrobacter aquiticus</i>	3.22	2814	43.1	Reddy <i>et al.</i> , 2013
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	3.1	2509	42.25	CP000323.1
<i>Psychrobacter arcticus</i>	2.65	2113	42.8	Ayala-del-Río <i>et al.</i> , 2010
<i>Methanococcoides burtonii</i>	2.58	2406	40.8	Saunders <i>et al.</i> , 2003
<i>Methanogenium frigidum</i>	2–2.5	1815		Saunders <i>et al.</i> , 2003
<i>Clostridium estertheticum</i>	4.76	4208	30.9	Yu <i>et al.</i> , 2016

Сравнительный анализ имеющихся геномов психрофильных и психроактивных бактерий свидетельствует о том, что адаптация к низким температурам, вероятно, обусловлена не набором уникальных генов, а множественными изменениями в общем геноме и аминокислотном составе белков (Methe *et al.*, 2005). В частности, снижением содержания пролина, увеличением количества пролизомераз, кодируемых в геноме психрофильных микроорганизмов, и избыточной экспрессией пролил-изомераз при низкотемпературном культивировании и другие (Feller, 2017). Учитывая множество различных адаптивных механизмов, которые используются различными психрофильными организмами, и то, что относительно небольшое количество психрофильных организмов изучено подробно, можно ожидать, что еще не найдены новые стратегии выживания при низких температурах. Выделение новых психрофильных организмов из постоянно холодных экосистем, секвенирование их геномов и интеграция «омических» подходов в

системах биологических платформ расширят наше понимание того, что лежит под поверхностью психофильного айсберга (De Maayer *et al.*, 2014).

ГЛАВА 3. ДОМЕН *ARCHAEA*: РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ

3.1. Происхождение и эволюция

Как известно, основываясь на микроскопических наблюдениях клеток, биологи разделили живые организмы на две группы: прокариоты и эукариоты (Chatton, 1937; Murray, 1968; Stanier *et al.*, 1976; Margulis, 1993). Позже данная теория была уточнена Везе и коллегами с помощью анализа неполных последовательностей 16S рРНК (Woese, 1987, 1992). Результатом этого исследования стало разделение прокариот на две эволюционные линии, обозначенные как первичные царства. В основу концепции наличия трех доменов были положены различия на клеточном уровне между тремя филогенетически отдельными линиями, которые рано отделились от общей предковой группы организмов. «Типичные» бактерии, например, *E. coli*, были отнесены к царству бактерий, и несколько типов организмов, фенотипически отличающихся от бактерий, - к царству архей. Отличие же архей было также подтверждено на основании наличия ряда белков, таких как, факторы элонгации EF-1/Tu и EF-2/G, II и III субъединицы РНК-полимеразы, F- и V-типов АТФаз (Iwabe *et al.*, 1989; Puhler *et al.*, 1989; Gogarten *et al.*, 1989) и уникальных липидов с эфирными лигандами (Kandler and Konig, 1993). Это и привело к тому, что археи составили третий домен жизни в дополнение к эубактериям и эукариотам (Woese *et al.*, 1990).

Установление степени родства между тремя доменами имеет ключевое значение для понимания возникновения жизни. Большинство метаболических путей, в которых задействована большая часть генов организма, схожи у бактерий и архей, в то время как гены, отвечающие за экспрессию других генов, очень похожи у архей и эукариот (Koonin *et al.*, 1997). По строению клеток наибольшее сходство археи имеют с грамположительными бактериями и, в отличие от грамотрицательных, окружены единственной клеточной мембраной.

Кроме того, важнейшим свойством, объединяющим бактерий и архей, является наличие одинаковых консервативных участков белков, таких как Hsp70 (Gupta *et al.*, 1998), глутамат синтетазы I (Brown *et al.*, 1994) и аспарагил тРНК синтетазы (Gupta, 1997). Что касается родства архей и эукариот, то данный вопрос остается неясным и является предметом научных споров и одной из самых обсуждаемых тем эволюционной биологии. Несмотря на то, что существует большое количество конкурирующих гипотез, считается, что геномы эукариот являются химерными, то есть эукариотические гены, связанные с обработкой информации, эволюционировали из гомологичных генов *Euryarchaeota* или *Crenarchaeota*, а гены, отвечающие за метаболические пути, имеют бактериальное происхождение (Yutin *et al.*, 2008; Spang *et al.*, 2013).

Существуют также непроверяемые данные, что между эубактериями и археями происходил горизонтальный перенос генов. Например, в геноме термофильной бактерии *Thermotoga maritima* обнаружено 24% генов, схожих с генами архей (Nelson *et al.*, 1999).

Экстремофильные свойства многих архей сделали их отправной точкой в теории возникновения жизни на Земле. Штеттер (Stetter *et al.*, 2006) предположил, что гипертермофилы, являлись хемолитоавтотофами, могли населять раннюю Землю. Это соответствует способности сохранившихся архей развиваться в таких экстремальных местах обитания, как горячие источники (Auguet *et al.*, 2010).

После первых публикаций, в которых археи рассматривались как возможные прямые потомки эволюционно древних микроорганизмов, они стали излюбленным объектом исследований в области эволюции, ультраструктуры, генетики, биохимии и биофизики. С учетом того, что археи хорошо растут преимущественно в экстремальных условиях, усилия исследователей были сосредоточены на выделении новых филогенетических линий архей из таких экосистем, как горячие источники, глубоководные гидротермы и щелочные озера, что привело к описанию многочисленных микроорганизмов с ранее не изученными свойствами (рис. 5).

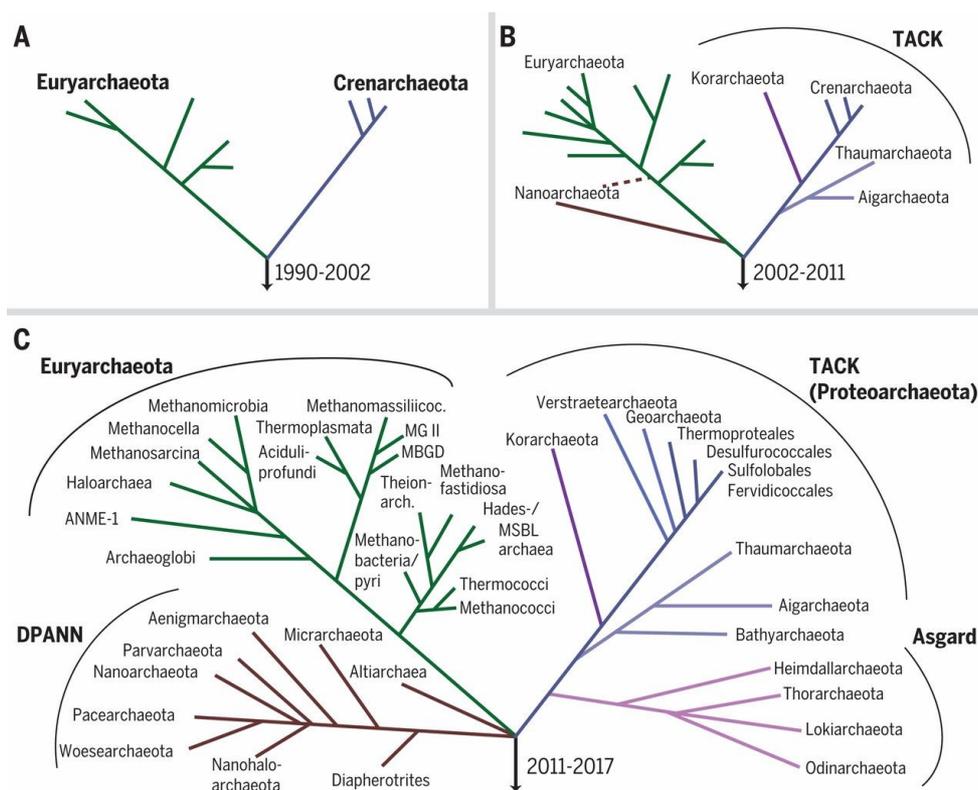


Рис. 5. Расширение разнообразия архей за 40 лет (Spang *et al.*, 2017).

Вскоре после того, как домен *Archaea* стали считать таксономически обособленным, возник вопрос о положении корня архейного древа жизни, что является необходимым для установления эволюционных отношений между филумами и выявления природы общего предка. До настоящего времени корень архейного домена размещали между филумами *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* (Woese *et al.*, 1990), однако недавние исследования изменили данную концепцию, поместив корень древа архей в пределах филума *Euryarchaeota*, что фактически разделило этот филум на два больших кластера: Кластер I, включающий *Proteoarchaeota*/ТАСК, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* и *Thermococcales*, и Кластер II, содержащий всех остальных *Euryarchaeota* (Raymann *et al.*, 2015). Данная теория позволяет по-новому взглянуть на происхождение и эволюцию архей. Оба эти кластера включают метаногенные линии, что не исключает вероятности наличия у последнего общего архейного предка способности к метаногенезу, которая могла быть неоднократно утрачена во время эволюции. (Raymann *et al.*, 2015). Большое количество недавно обнаруженных метаногенных линий, включая членов суперфилума ТАСК (Evans *et al.*, 2015; Vanwonterghem *et al.*, 2016), также поддерживают эту теорию (Bogrel *et al.*, 2016). Однако в зависимости от применяемого метода изучения филогении архей исследователи получают данные, показывающие, что самыми древними архейными линиями могут быть *Nanohaloarchaea*, *Nanoarchaeota*, ARMAN или *Thermococcales* (Guy *et al.*, 2011; Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Yutin *et al.*, 2012).

3.2 Классификация архей

Классификация архей быстро меняется и во многом остаётся спорной. Современные системы классификации стремятся объединить архей в группы организмов со схожими структурными свойствами и общими предками. На основе филогенетической реконструкции эволюционной истории гена 16S рРНК домен *Archaea* первоначально был разделён на два основных филума: *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* (Woese *et al.*, 1990), включающих соответственно метаногенных и экстремофильных (термофильных, галофильных и ацидофильных) микроорганизмов. Однако новые культурально независимые и высокопроизводительные методы секвенирования позволили открыть огромное разнообразие новых архейных видов, многие из которых участвуют в важных экологических процессах и только отдаленно связаны с филумами *Cren-* и *Euryarchaeota*. Это позволило расширить представления о филогенетическом разнообразии третьего домена жизни и включить новые филумы и суперфилумы (Rinke *et al.*, 2013) (рис. 5).

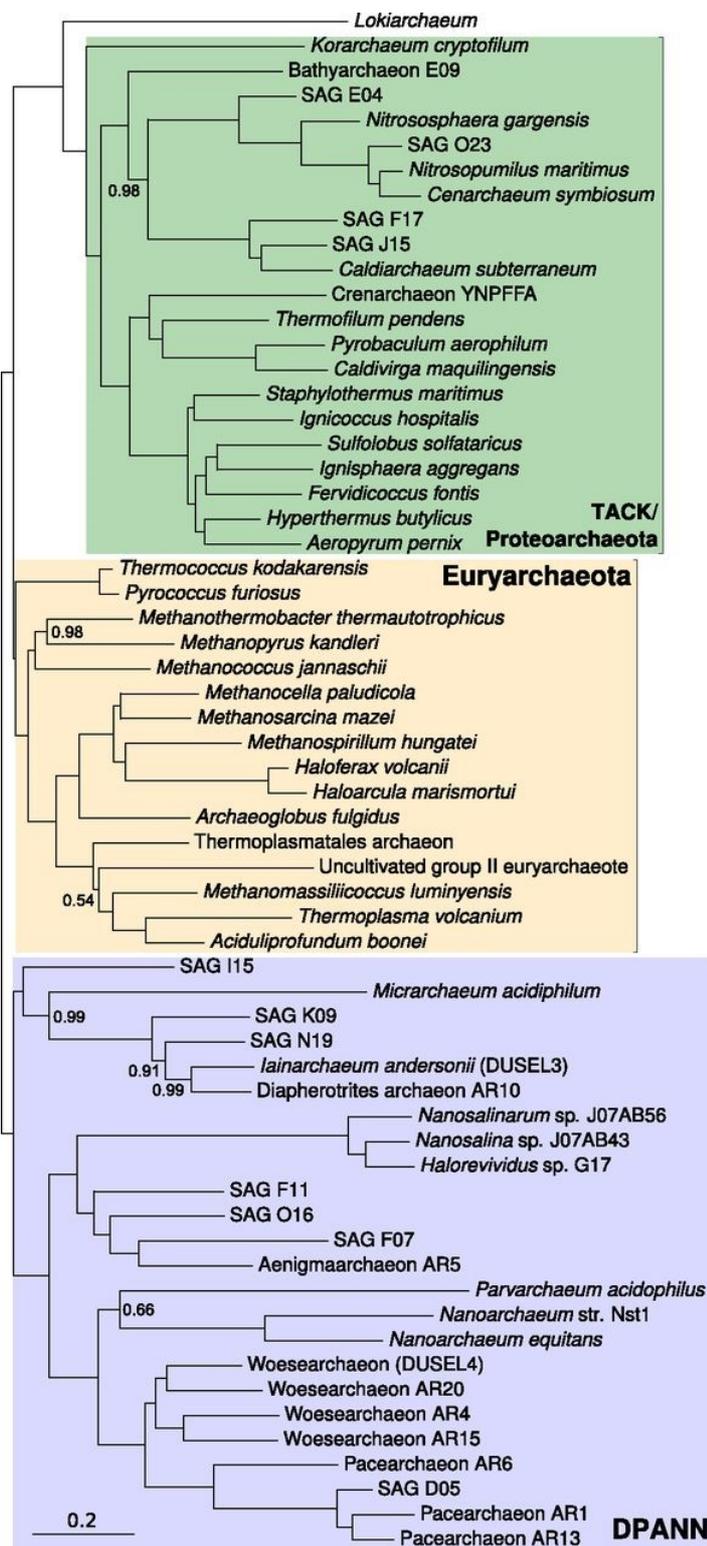


Рис. 6. Корневое древо архей, построенное на основе статистических алгоритмов (Williams *et al.*, 2017).

Так, например, в результате анализа последовательностей гена 16S рНК оказалось, что давно отделившимся от других архей и не принадлежащим к их основным группам является филум *Korarchaeota*. Анализ генома единственного на данный момент описанного

некультивируемого вида '*Candidatus* Korarchaeum cryptofilum' (Elkins *et al.*, 2008), полученного из образца горячего источника, указал на наличие схожих с *Cren-* и *Euryarchaeota* признаков, что подтверждает гипотезу о возможном существовании общего предка с данными группами (рис. 6).

В результате геномного и филогенетического анализа конкатенированных рибосомальных белков (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) был предложен другой филум *Thaumarchaeota*, а входящие в его состав археи представляют собой аэробных аммоний-окисляющих микроорганизмов, населяющих морские (Группа I.1a/ *Nitrosopumilales*, *Nitrosopumilus*, *Nitrosoarchaeum*, *Cenarchaeum*) и почвенные экосистемы (Группа I.1b/ *Nitrososphaerales*, *Nitrososphaera*) (Pester *et al.*, 2011). Дополнительные комплексные филогенетические исследования и обнаружение набора генов, отвечающих за репликацию, транскрипцию и трансляцию ДНК, а также механизмов клеточного деления укрепили независимое положение филума *Thaumarchaeota* (Nunoura *et al.*, 2010; Kozubal *et al.*, 2013) и расширили границы данного филума. Новый геном, полученный из торфяников (Lin *et al.*, 2015) а также еще два – из кислых источников Йеллоустонского парка (Beam *et al.*, 2014), добавили к *Thaumarchaeota* новые филогенетические ветви. Так, предполагается, что археи ветви Fn1 получают энергию путем окисления летучих жирных кислот, либо в результате синтрофной ассоциации с метаногенами (Lin *et al.*, 2015), тогда как Beowulf и Dragon являются типичными хемоорганотрофами и растут на разнообразных углеводах, пептидах и аминокислотах (Beam *et al.*, 2014). Неожиданным оказался тот факт, что во всех трех (почти полных) геномах отсутствовали гены *amoABC*, отвечающие за окисление аммиака (Beam *et al.*, 2014), что указывает на то, что эта особенность не является характерной для всех представителей филума.

Данные геномных исследований в значительной степени расширили представления о сестринском филуме *Thaumarchaeota* - *Aigarchaeota*, который представляет собой ветвь архей, широко распространенных в умеренных или очень жарких земных, морских и подземных экосистемах (Hedlund *et al.*, 2015). Способность к аэробнозису ввиду наличия в геномах *Thaumarchaeota* и *Aigarchaeota* цитохромоксидазы ставит вопрос о том, предшествовало ли приобретение данного свойства расхождению этих филумов или развилось независимо. Первые опубликованные данные о геноме '*Ca. Caldiarchaeum subterraneum*' филума *Aigarchaeota* были получены в результате исследования подземных геотермальных вод (Nunoura *et al.*, 2005, 2010). Транскриптомный анализ другого микроорганизма '*Ca. Caldithenuis aerorheumensis*', выделенного из микробного сообщества горячего источника, выявил метаболический потенциал *Aigarchaeota in situ* (Beam *et al.*,

2016). Представители данного филума были хемоорганогетеротрофами, разлагающими аминокислоты и жирные кислоты, пептиды и углеводы, и имели нитчатые структуры. У этих микроорганизмов отсутствовала способность синтезировать витамины и кофакторы, которые они, вероятно, получают от других членов сообщества (Beam *et al.*, 2016).

Изучение филума *Nanoarchaeota* началось с описания нового вида *Nanoarchaeum equitans*, представляющего собой мелкие паразитические клетки, растущие на поверхности клеток археона, *Ignicoccus hospitalis*. Последующие более тщательные филогенетические исследования выявили возможные генетические признаки предков, что дало основание отнести данный организм к отдельному архейному филуму (Waters *et al.*, 2003; Giulio *et al.*, 2009; Yutin *et al.*, 2012). Однако, в результате использования разных методов при определении точного филогенетического положения, исследователи получают противоречивые результаты (Lloyd *et al.*, 2013). Согласно последним данным (Rinke *et al.*, 2013) *Nanoarchaea* составляет отдельную линию в пределах суперфилума DPANN (*Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaea*).

Bathyarchaeota – новая ветвь суперфилума TACK, близкая ветви *Taumarchaeota/Aigarchaeota*. Все эти линии сближает наличие топоизомеразы IB, характерной для эукариот (Meng *et al.*, 2014). Филум *Bathyarchaeota* включает 17 семейств, представители которых представляют значительную часть наземных и морских экосистем (Kubo *et al.*, 2012; Lloyd *et al.*, 2013) и обладают разными типами метаболизма, а также широким спектром адаптационных возможностей. Для шести семейств в настоящее время имеются доступные геномные данные, анализ которых и эксперименты с ¹³C-мечеными субстратами, позволил установить, что археи *Bathyarchaeota* в качестве источников углерода и энергии способны использовать пептиды, углеводы, жирные кислоты или ароматические соединения (Lloyd *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016). Кроме того некоторые члены филума обладают генами, отвечающими за образование ацетата из CO₂ и H₂ (He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016). Отмечено также их возможное участие в метановом цикле (Evans *et al.*, 2015). Такая метаболическая гибкость и способность к росту на широком спектре субстратов дает экологическое преимущество для представителей филума *Bathyarchaeota* и подчеркивает важную роль данной группы в цикле углерода.

Еще одним из недавно предложенных архейных филумов является филум *Geoarchaeota*, включающий новую группу NAG-1, и возникший как начальная ветвь филума *Crenarchaeota*. Выделение данной линии в отдельный филум оказалось возможным в результате филогенетического анализа конкатенированных последовательностей рибосомальных белков (16S/23S рРНК), а также генов информационного процессинга

(Kozubal *et al.*, 2013). Представители этой группы были обнаружены в кислом источнике Йеллоустонского национального парка (Kozubal *et al.*, 2012, 2013). Микроорганизмы группы NAG-1 выживают в условиях горячих (60-78°C) кислотных матов, обогащенных железом. Предполагается, что для гетеротрофного роста они используют простые углеродные соединения.

В 2015 году были опубликованы результаты исследований генома, собранного при метагеномном анализе морских отложений Атлантического океана вблизи гидротермального источника замка Локи (Jorgensen *et al.*, 2012). Анализ данных указал на большое количество маркеров эукариотических белков, отвечающих за изменение формы клеточной мембраны и функции цитоскелета. На основании этих данных авторы предложили новый филум — *Lokiarchaeota* с предполагаемым родом *Lokiarchaeum*. Результаты этого исследования являются подтверждением того, что эукариоты появились как особая группа внутри домена *Archaea*, близкая к *Lokiarchaeota* (Spang *et al.*, 2015). Совсем недавно были получены геномные последовательности трех дополнительных филумов, тесно связанных с *Lokiarchaeota*: *Thorarchaeota*, *Heimdallarchaeota* и *Odinarchaeota* (Seitz *et al.*, 2016; Zaremba - Niedzwiedzka *et al.*, 2017), которые образуют суперфилум, называемый Asgard. Представители этого суперфилума населяют анаэробные морские и озерные отложения и участвуют в цикле углерода. Кроме того, организмы группы *Thorarchaeota* имеют гены, необходимые для восстановления элементарной серы и тиосульфата и поэтому участвуют в круговороте серы (Seitz *et al.*, 2016).

Существующая до недавнего времени центральная догма о метаногенезе как метаболическом цикле, присущем только филуму *Euryarchaeota*, в настоящее время подвергается сомнению благодаря обнаружению предполагаемых генов метаболизма метана у представителей других архейных филумов. Это свидетельствует о том, что метаногенез может быть филогенетически более распространенным, нежели считается в настоящее время. Эванс и коллеги (Evans *et al.*, 2015) провели метагеномное исследование угольного месторождения Сурат бассейна (Австралия), в результате которого получили два почти полных генома (Ba1 и Ba2), относящихся к филуму *Bathyarchaeota*. Результаты метаболической реконструкции генома Ba1 указали на наличие большого числа генов пути Вуда - Льюнгаля и генов, участвующих в метаболизме метана, среди которых были гены, кодирующие метил – коэнзим М редуктазный комплекс - *mcrABG* и *mcrCD* и отвечающие за метаногенез из метилсульфидов – *mtsA*, метанола – *mtbA*, метиламинов - *mtaA*, *mttBC*, *mtbBC*, а также три субъединицы *mtrH*. Наличие таких генов свидетельствует о способности использовать различные метильные соединения, что свойственно облигатным H₂-

использующим метилотрофным метаногенам порядка *Methanomassiliicoccales*. Кроме того, в геноме были идентифицированы двенадцать новых метилтрансфераз, сходных между собой, но отличающихся от уже известных, что говорит о том, что микроорганизмы могут использовать для метаболизма дополнительные метилированные соединения. Поиск гомологичных и консервативных последовательностей гена *mcrA* доступных метагеномов, полученных из метаногенных экосистем, таких как нефтеносные песчаники Канады, нефтегазоносный бассейн Северного моря и некоторые другие водные экосистемы, указал на большое сходство с фрагментами гена *mcrA*, нехарактерного как для филума *Euryarchaeota*, так и для филума *Bathyarchaeota* (Evans *et al.*, 2015). Данные результаты дают основания полагать, что *mcrA* ген эволюционировал как функциональная единица, а метаболизм метана был свойственен общему предку *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota*.

В результате культивирования образцов из природных и искусственных экосистем, в ходе которого наблюдалось стабильное образование метана, были получены шесть почти полных метагеномов, содержащих четыре гена *mcrA* (Vanwonterghem *et al.*, 2016). Гомологичные последовательности трех исследованных геномов были на 94-99% идентичны геномам метаногенных линий филума *Euryarchaeota*, в то время как ген *mcrA* четвертого генома оказался дивергентным. В результате метагеномного анализа образцов анаэробного биореактора (Малайзия), нефтеносных песчаников (Канада) и угольных скважин Австралии были обнаружены идентичные последовательности дивергентного гена *mcrA*. Филогенетический анализ генов 16S рРНК показал, что обнаруженные последовательности образуют кластер с клонами смешанной группы кренархей (ТМCG), а сравнительный анализ геномов показал 41±1.5% сходства по аминокислотным остаткам с другими представителями *Archaea*, что указывает на таксономическую обособленность нового филума, для которого было предложено название *Verstraetearchaeota*.

Метаболическая реконструкция геномов нового филума выявила наличие ключевых генов метилотрофного метаногенеза (*mcrA*, *mcrABG*, *mcrCD*, *mtaA*, *mtsA*, Н субъединица гена *mtrH*) и отсутствие генов гидрогенотрофного и ацетокластического метаногенеза. В дополнение к метаногенезу представители филума *Verstraetearchaeota* могут использовать сахара в качестве источника углерода и образовывать ацетил-коэнзим А по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Кроме того, в геномах представителей данного филума было обнаружено большое количество генов, кодирующих белки – переносчики пептидов и аминокислот, позволяющих *Verstraetearchaeota*, как предполагается, получать энергию в результате субстратного фосфорилирования (Musfeldt *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016).

Разработка методов, не зависящих от культивирования, обеспечила доступ к геномным данным большого количества архейных линий, которые были недоступны до этого времени, что, в свою очередь, позволило по-новому взглянуть на разнообразие и метаболический потенциал архей из различных мест обитания. Архейное древо быстро заполняется новыми филумами, тем самым предоставляя информацию о происхождении и эволюции этого домена, включающего огромное разнообразие, которое еще предстоит исследовать.

3.3. Методы изучения архейного разнообразия

Изучение таксономического разнообразия архейных сообществ, как и других микроорганизмов, включает методы как подразумевающие культивирование архей, так и методы, не связанные с культивированием.

Более специфический подход для детекции метаногенных архей дает использование функционального гена метил-коэнзим М редуктазы (*mcrA*) (Friedrich, 2005). Для определения различных филогенетических групп метаногенных архей были разработаны системы праймеров на консервативные участки гена метил-коэнзим М редуктазы (Springer *et al.*, 1995; Luton *et al.*, 2002; Colwell *et al.*, 2008), а также на 16S рРНК (Narihiro and Sekiguchi, 2011).

Для исследования сложных микробных сообществ используют метод создания клоновых библиотек как для гена 16S рРНК (Tajima, 2001), так и для гена *mcrA* (Luton *et al.*, 2002). Данный метод обладает относительно высоким разрешением и считается недорогим.

Также для определения разнообразия архей в многолетнемерзлых отложениях используется метод ДГГЭ/ТГГЭ денатурирующий/температурный градиентный гель-электрофорез (Wilhelm *et al.*, 2011).

В последнее время для первичной идентификации труднокультивируемых микроорганизмов все шире используется метод времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии (Biswas *et al.*, 2013). Применение этого способа диагностики для архей сдерживается отсутствием данных о белковых профилях этой группы прокариот. Несмотря на ограниченность данных о белковых профилях в отношении архей, есть сведения, что с помощью данного метода удавалось идентифицировать некоторых метаногенов (Krader and Emerson, 2004).

Для визуализации клеток архей применяют метод флуоресцентно меченых РНК-зондов (FISH) (Amann *et al.*, 1995). С помощью данного метода микроорганизмы не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным таксонам. Для повышения точности и чувствительности метода вплоть до количественной оценки активности единичной клетки вместо стандартной флуоресцентной гибридизации

используется технология CARD-FISH - катализируемое осаждение метки с флуоресцентной гибридизацией *in situ*. Метод CARD-FISH основан на применении меченых молекул тирамина (Wilhartitz *et al.*, 2007).

Для количественной детекции прокариот используется метод ПЦР “в реальном времени” (qPCR или количественная ПЦР) (Heid *et al.*, 1996), позволяющий делать количественную оценку как общей популяции архей, так и определять численность отдельных филогенетических групп (Yu *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2008; Nunoura *et al.*, 2008).

Наличие активной популяции метаногенных архей в природных образцах может быть проверено с помощью меченых изотопов субстратов, используемых этими микроорганизмами для генерации метана. Так, с помощью $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ и $\text{Na}^{14}\text{CH}_3\text{COO}$ было показано образование метана в многолетнемерзлых отложениях при температуре до -16.5°C (Rivkina *et al.*, 2004, 2007).

3.4. Разнообразие некультивируемых архей в вечной мерзлоте

Главными причинами изучения разнообразия микроорганизмов в многолетнемерзлых отложениях с применением культурально-независимых методов являются сложность культивирования и низкая продукция биомассы. Согласно некоторым данным (Yergeau *et al.*, 2010) в вечной мерзлоте содержится в двадцать раз меньше клеток, чем в активном слое. Однако применение молекулярных методов, основанных на сравнении нуклеотидных последовательностей генов или геномов, позволяет идентифицировать новые филогенетические группы, для которых еще нет культивируемых представителей. Так, амплификация 16S рРНК генов в сочетании с современными техниками секвенирования сделала возможным определение микробного состава в образцах вечной мерзлоты (Zhou *et al.*, 1997; Нøj *et al.*, 2005; Ganzert *et al.*, 2007; Steven *et al.*, 2008; Yergeau *et al.*, 2010; Taş *et al.*, 2014; Rivkina *et al.*, 2016).

Большинство исследований, направленных на изучение архейного разнообразия в арктических ММО, были сконцентрированы на мерзлоте Сибири (Shi *et al.*, 1997; Liebner *et al.*, 2007). Изучение ММО морского происхождения в дельте реки Лена (Сибирь) показали, что общее количество клеток в активном слое равнялось 3×10^8 кл/г, 22% которых составляли археи (Kobabe *et al.*, 2004).

Ривкиной с соавторами (Rivkina *et al.*, 2016) были проведены метагеномные исследования двух образцов ММО Арктики (Колымская низменность): образца ледового комплекса (глубина 16 м) и образца позднеплейстоценовых многолетнемерзлых отложений (глубина 22 м). Данные образцы были приблизительно одного возраста, но различались содержанием метана, который был обнаружен только во втором образце. Полученные

результаты показали, что археи были обнаружены и в том, и в другом образцах. Но метаногенные археи были приурочены к образцу, содержащему метан, и являлись представителями родов *Methanosarcina* (0.14% от общего числа секвенированных последовательностей), *Methanoregula* (0.03%), *Methanoculleus* (0.05%), *Methanosphaerula* (0.03%), *Methanospirillum* (0.03%), и *Methanosaeta* (0.03%).

Канадским исследователям (Steven *et al.*, 2007) удалось охарактеризовать некультивируемое архейное сообщество ММО острова Элсмир с глубины 9 м. Были проанализированы 56 клонированных последовательностей архейных генов 16S рРНК, которые были объединены в оперативные таксономические единицы (ОТЕ), принадлежащие филумам *Crenarchaeota* (3 ОТЕ) и *Euryarchaeota* (8 ОТЕ), при этом две ОТЕ филума *Euryarchaeota* были отнесены к культивируемым археям родов *Halobaculum* and *Haloarcula*, а остальные не были идентифицированы.

В результате исследования состава архейного сообщества многолетнемерзлых отложений Цинхай-Тибетского плато (Wei *et al.*, 2014) были получены библиотеки клонов гена 16S рРНК, филогенетический анализ которых показал, что 47.2% последовательностей относились к филуму *Crenarchaeota* и 52.8% - к *Euryarchaeota*. Реконструированные последовательности *Crenarchaeota* объединились в одну филогенетическую группу 1.3b/MCG-A (Ochsenreiter *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2014). В то же время последовательности *Euryarchaeota* разбились на филогенетические группы *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae* и неклассифицированную группу *Euryarchaeota* с процентным содержанием архейных клонов 0.3; 1.1; 1.4 и 50.0 %, соответственно. В этом исследовании также было показано относительное распределение различных филогенетических групп в зависимости от глубины. Так, и в активном слое, и в многолетней мерзлоте доминантными были филумы *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*, однако в процентном соотношении в активном слое преобладал филум *Crenarchaeota* (51.2% *Crenarchaeota* и 48.8% *Euryarchaeota*), а в более глубоких слоях многолетнемерзлых отложений – филум *Euryarchaeota* (58.8% *Euryarchaeota* и 41.2% *Crenarchaeota*) (Wei *et al.*, 2014).

В ММО прибрежной зоны моря Лаптевых с помощью филогенетического анализа клонированных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК удалось идентифицировать представителей некоторых групп филума *Euryarchaeota*, а именно *Methanosarcinaceae* (11 последовательностей), *Methanosaeta* (2), *Methanomicrobiales* (12), 2 последовательности были отнесены к некультивируемому кластеру Rice II (Ganzert *et al.*, 2007).

Немецкими учеными были проанализированы архейные сообщества мерзлых отложений подводных отложений в районе моря Лаптевых (Winkel *et al.*, 2018). Анализ

результатов выявил анаэробные метанотрофные комплексы морского и наземного происхождения (ANME-2a/b, ANME-2d) как в мерзлых, так и в полностью размороженных глубоководных отложениях вечной мерзлоты. Помимо архей, потенциально связанных с анаэробным окислением метана (АОМ), было обнаружено большое разнообразие представителей *Bathyarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*. Анализ функциональных маркерных генов (*mcrA*) и результатов флуоресценции *in situ* гибридизации (FISH) подтверждают потенциальную активность сообществ АОМ в подводных отложениях вечной мерзлоты при низких температурах. Моделируемый потенциал АОМ составляет 72-100% метана, образующегося в подводной вечной мерзлоте. Это сопоставимо с местами обитания АОМ, такими как холодные сипы.

3.5 Метанобразующие археи

Как известно, биогенный метан образуется в ряде биохимических реакций, выполняемых группой строго анаэробных метаногенных архей (Ferry, 1993; Zinder, 1993; Ferry, 2010). Их естественной средой обитания в арктических регионах является тундра, богатая органическим веществом. Арктические тундровые грунты в Сибири находятся в постоянно замерзшем состоянии, исключение составляет активный слой с сезонными циклами замораживания-оттаивания в диапазоне температур от -57 до -45°C в зимний период и до 25°C летом (Wagner *et al.*, 2005). Образование метана, сопровождаемое выбросом с поверхности, наблюдается в современных тундровых почвах (Whalen *et al.*, 1990; Kotsyurbenko *et al.*, 1996, 2004; Wagner *et al.*, 2003) и донных отложениях болотных озер (Zimov, 1997; Nozhevnikova *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2006). Согласно исследованиям, значительное количества метана было выведено из биогеохимического цикла и сохраняется ниже сезонного-талого слоя (Rivkina *et al.*, 1992; Gilichinsky *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1998) глубиной в несколько сотен метров, следовательно, такие залежи метана в вечной мерзлоте являются огромным потенциальным источником древнего СН₄. Кроме того, как показывают исследования, кроме метана в многолетнемерзлых отложениях также сохранились анаэробные микроорганизмы, в том числе метаногенные археи (Rivkina *et al.*, 1998).

3.5.1. Общая характеристика и распространение

Метаногенные археи - это специализированная группа микроорганизмов, выполняющая важную экологическую и метаболическую функции в природных экосистемах. Они участвуют в анаэробном разложении органического вещества и отвечают за осуществление терминальной стадии с образованием метана.

Метаногены населяют различные природные и антропогенные экосистемы с широким диапазоном физико-химических условий: морские (Kendall *et al.*, 2006) и пресноводные осадки (Borrel *et al.*, 2012), нефтяные залежи (Jeanthon *et al.*, 2005), рисовые поля (Kitamura *et al.*, 2011), озера (Zhu *et al.*, 2011), торфяные болота (Bräuer *et al.*, 2006), биореакторы (Yashiro *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2015) и пищеварительный тракт животных (Miller and Wolin, 1986; Jensen, 1996). Метаногенные археи приспособились к экстремальным условиям существования при кислых и щелочных значениях pH (Worakit *et al.*, 1986), высоких концентрациях солей (Zhilina *et al.*, 2013; Sorokin *et al.*, 2015), кислот (Savant *et al.*, 2002), а также обнаружены в гидротермальных вентх (Stewart *et al.*, 2015) и наземных горячих источниках (Ding *et al.*, 2010). Благодаря культурально-независимым методам стало возможным идентифицировать, а в последствие выделить и описать метаногенных архей в сезонно-талых арктических почвах (Wagner *et al.*, 2013).

В состав группы входят археи с разной морфологией: прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной формы, близкие к коккам; извитые формы. У некоторых видов наблюдается тенденция формировать нити или пакеты. Клетки неподвижные или передвигающиеся с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. У представителей рода *Methanosarcina* в клетках найдены газовые вакуоли (Zhilina and Zavarzin, 1987). Для некоторых метаногенов характерна развитая система внутриклеточных элементарных мембран, являющихся результатом разрастания и впячивания в цитоплазму ЦПМ и сохраняющих с ней связь. У этой группы архей обнаружены клеточные стенки трех типов: состоящие из псевдомуреина, построенные из белковых глобул и гетерополисахаридной природы.

У метаногенов 20 - 30% мембранных липидов представлены нейтральными и 70 - 80% – полярными липидами. Последние – это, в основном, полярные фосфо- и гликолипиды, образующиеся на основе простых эфиров глицерина и терпеноидных спиртов (C₂₀-фитаниловый и C₄₀-бифитаниловый). В зависимости от вида клеточные мембраны могут содержать оба типа эфиров или только один. Основными нейтральными липидами являются C₂₀-, C₂₅- и C₃₀-ациклические изопреноидные углеводороды, насыщенные или содержащие двойные связи. Запасные вещества в виде поли-β-оксимасляной кислоты или гликогена в клетках метаногенов не обнаружены. Метанобразующие археи – строгие анаэробы, их рост возможен при начальном окислительно-восстановительном потенциале среды ниже – 250 мВ. Рост практически всех видов полностью подавляется при содержании в газовой фазе более 0.004% молекулярного кислорода. Однако, описаны виды с относительно низкой чувствительностью к O₂, в клетках которых обнаружена супероксиддисмутаза (Brioukhanov

et al., 2006). Возможно, в природе такие виды могут сохранять жизнеспособность при кратковременных контактах с воздухом и возобновлять рост в анаэробных условиях.

Большинство метанобразующих архей имеют температурный оптимум роста в области 30-40°C, т.е. являются мезофилами, но есть виды, у которых оптимальная зона сдвинута в сторону более низких или высоких температур. Так, выделены экстремально термофильные организмы родов *Methanothermus* и *Methanocaldococcus*, растущие при температурах 55-97°C. Облигатные психрофилы представлены среди метаногенов единственным видом *Methanogenium frigidum* (Franzman *et al.*, 1997). Однако, известен ряд психроактивных метанобразующих архей с температурным оптимумом роста от 15 до 28 °C, относящихся к родам *Methanococcus*, *Methanogenium*, *Methanococcoides*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* и *Methanospirillum* (Franzmann *et al.*, 1992; Simankova *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2002; von Klein *et al.*, 2002; Singh, 2005; Kendall *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2013; Parshina *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014) и выделенные как из природных, так и антропогенных мест обитания.

Большая часть метаногенов – нейтрофилы с оптимальным pH в области 6.5-7.5. Среди метаногенов есть галофилы (роды *Methanosalsum*, *Methanocalculus*), требующие в качестве одного из оптимальных условий для роста содержания в среде до 65-70 г/л NaCl.

Метаногены используют узкий круг соединений в качестве источника углерода и энергии, в числе которых наиболее универсальной является газовая смесь H₂ и CO₂ (более ¾ видов). Некоторые метаногены, например, представители родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* и *Methanococcus*, являются облигатными автотрофами. Следующими по распространенности источниками углерода и энергии служат формиат, ацетат, метанол, метиламины и моноокись углерода. Около половины изученных видов не нуждаются в каких-либо органических соединениях. Для роста многих культур в атмосфере H₂ и CO₂ требуется внесение в среду органических веществ, стимулирующих рост или абсолютно для него необходимых. Это могут быть некоторые витамины группы B, ацетат, пируват, сукцинат, отдельные аминокислоты, дрожжевой экстракт или компоненты неизвестного состава, содержащиеся в природных средах обитания. Сложные органические соединения метанобразующие археи использовать не могут. В качестве источника азота метаногены используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Для ряда видов показана способность к азотфиксации. Источником серы могут служить сульфаты, сульфид или серосодержащие аминокислоты.

Порядок *Methanosarcinales* представлен ацетотрофными и/или метилотрофными организмами, обитающими в пресноводных и морских осадках, бескислородных почвах, отходах животноводства, анаэробных биореакторах. Эти метаногены способны использовать

наиболее широкий спектр субстратов. Они образуют метан не только из C₁- и C₂-соединений, но и из нитроароматических соединений, тетрахлорэтилена, хлороформа и трихлорфторметана. Процесс превращения ацетата и метанола в метан известны у представителей родов *Methanosarcina* и *Methanotherix*. Полная схема образования метана метанобразующими археями из метилированных соединений и ацетата представлена на рис. 7.

3.5.2 Современные представления о филогении метаногенов

Ранее всех описываемых метаногенов было принято относить к трем категориям, основываясь на типах их питания: водородпотребляющие метаногены, ацетокластические и метаногены, использующие соединения с метильной группой, такие как метанол и метиламины (García *et al.*, 2000). Согласно исследованиям, некоторые метаногены также способны к окислению пирувата (Yang *et al.*, 1992), фурфурола (Belay *et al.*, 1997) и нитроароматических соединений (Voorthuyt *et al.*, 1994). В связи с этим фенотипических и пищевых особенностей стало недостаточно, чтобы различать таксоны. Поэтому в 1979 году (Balch *et al.*, 1979) было предложено использовать для таксономического анализа олигонуклеотидные последовательности 16S рРНК. На данный момент для описания новых таксонов принято использовать минимальные стандарты (Boone and Whitman, 1988), куда включены все важные фенотипические и генотипические характеристики исследуемых метаногенов.

Все известные метаногенные археи с валидированными названиями относятся к филуму *Euryarchaeota* и представляют классы: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia* и *Methanopyri* (<http://www.bacterio.net/methanobacterium.html>). В пределах классов было описано пять порядков: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, и *Methanopyrales* (Boone, 1993). Если к 1992 году было выделено и описано 18 родов и 60 видов метанобразующих архей, то теперь эта самая многочисленная группа филума *Euryarchaeota* насчитывает 36 родов и около 170 видов.

Порядок *Methanobacteriales* включает неподвижные метаногены с клеточной стенкой из псевдомуреина и сложных эфиров C₂₀ и C₄₀ в составе мембран. Данный порядок включает 2 семейства (*Methanobacteriaceae* и *Methanothermaceae*), объединяющих 5 родов (*Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanothermus*).

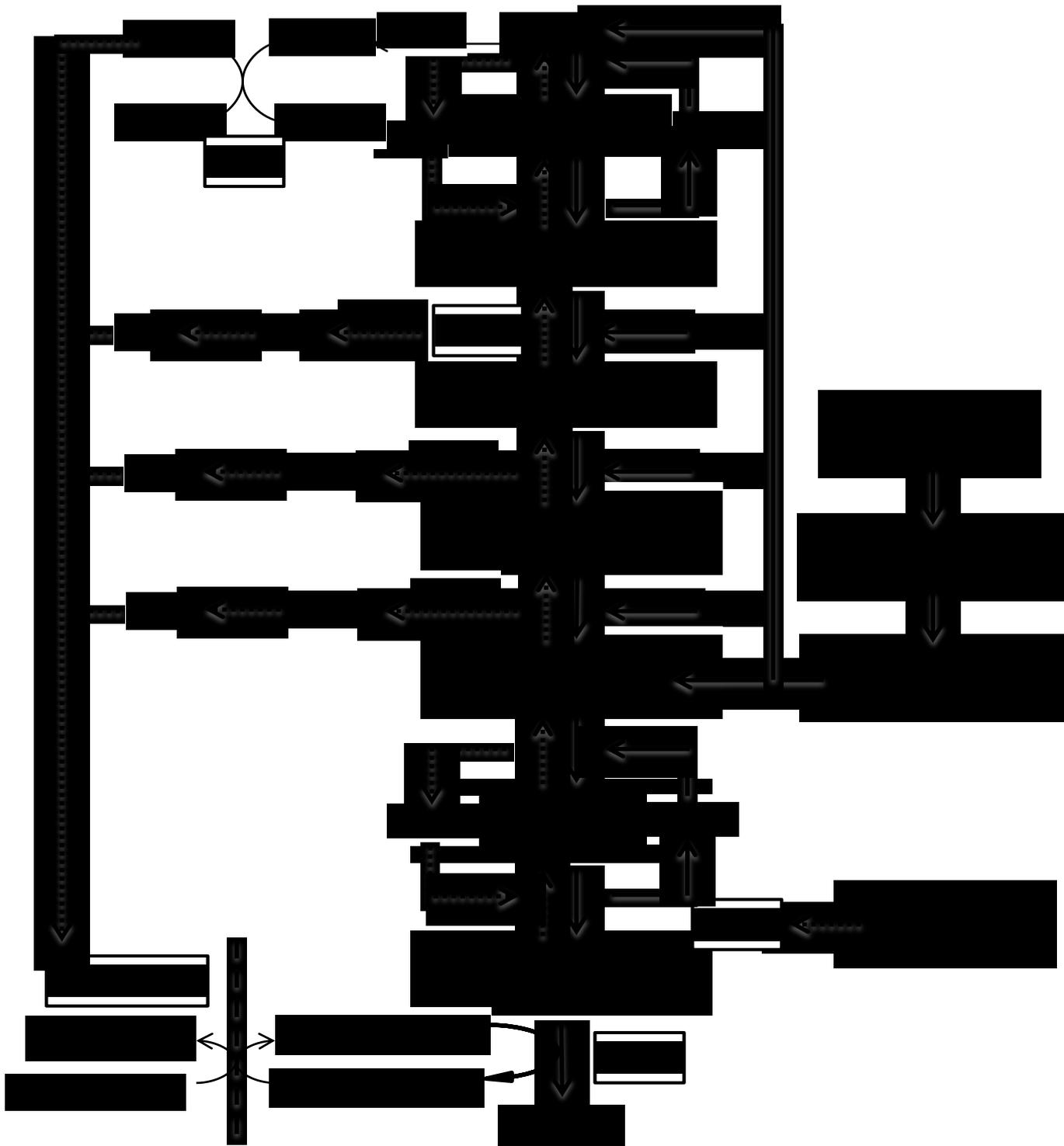


Рис. 7. Общая схема ацетокластического и метилотрофного путей метаногенеза (Welander and Metcalf, 2005)

Пунктирными стрелками показан метилотрофный путь, сплошными – ацетокластический (кроме последней стадии, общей для обоих путей). Некоторые части пути скрыты за пунктирной чертой. $Fd_{ox/red}$ – ферредоксин окисленный/восстановленный, CoM – кофермент M, Mtr – метилтрансфераза, Msr – метилредуктаза, MePh – метанофеназин, CoB – кофермент B (HS-HTP), Hdr – гетеродисульфид редуктаза, Ech – ферредоксин-зависимая гидрогеназа.

Порядок *Methanococcales* включает 2 семейства (*Methanococcaceae* и *Methanocaldococcaceae*) и 4 рода (*Methanococcus*, *Methanothermococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanotorris*). К этому порядку относятся водородиспользующие метаногены морских и прибрежных экосистем.

Порядок *Methanomicrobiales* содержит 4 валидированных и одно неклассифицированное семейства (*Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanospirillaceae*, *Methanoregulaceae*) и 12 родов (*Methanoculleus*, *Methanofollis*, *Methanogenium*, *Methanolacinia*, *Methanomicrobium*, *Methanoplanus*, *Methanocarpusculum*, *Methanospirillum*, *Methanolinea*, *Methanoregula*, *Methanosphaerula*, *Methanocalculus*) водородиспользующих метаногенов.

К порядку *Methanosarcinales*, который объединяет 3 семейства (*Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanimicrococcaceae*) и 12 родов (*Methanosarcina*, *Halomethanococcus*, *Methanimicrococcus*, *Methanomethylovorans*, *Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus*, *Methanosalsum*, *Methanohalobium*, *Methanosaeta*, *Methanotrix*, *Methermicrococcus*) относят метилотрофных и ацетатиспользующих метаногенов.

Порядок *Methanopyrales* включает семейство *Methanopyraceae* и род *Methanopyrus*, куда входит группа гипертермофильных метаногенов.

В настоящее время к имеющимся порядкам присоединились порядки *Methanocellales*, включающий семейство *Methanocellaceae* и род *Methanocella* (Sakai *et al.*, 2008), *Methanomassiliicoccales*, включающий семейство *Methanomassiliicoccaceae* и род *Methanomassiliicoccus* (Iino *et al.*, 2013).

Недавно получение накопительных культур из гиперсоленых озер в умеренно термофильных условиях привели к открытию ранее неизвестной глубокой филогенетической линии *Euryarchaeota*, близкородственной классу *Halobacteria*. Одиннадцать штаммов из содовых и три накопительных культуры из соленых озер оказались метаногенами, которые в качестве акцепторов электронов использовали C₁-метилованные соединения и H₂ или формиат в качестве доноров электронов. Новые археи представляют собой экстремальных галофилов, оптимально растущих в присутствии 4 М общего Na⁺. Подгруппа штаммов из соленых озер является нейтрофильной, тогда как метаногены содовых озер являются облигатными алкалофилами с оптимальным значением pH около 9.5. Генетическое разнообразие внутри двух подгрупп очень низкое, что указывает на то, что содовый и соленый кластеры состоят из представителей одной генетической разновидности. Филогенетическое расстояние между двумя подгруппами находится в диапазоне отдаленных родов, тогда как расстояние до других эвриархей составляет менее 83% сходства по гену 16S

pРНК. На основе различных фенотипических и генетических свойств изоляты из содового озера классифицированы в новый род и вид *Methanonatronarchaeum thermophilum*, а и метаногены соленого озера – вид-кандидат «*Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum*». Эти организмы предлагаются для формирования нового семейства, порядка и класса *Methanonatronarchaeaceae* fam. nov., *Methanonatronarchaeales* ord. nov. и *Methanonatronarchaeia* class nov., в пределах *Euryarchaeota* (Sorokin *et al.*, 2018).

3.5.3 Метаногенные археи из постоянно холодных экосистем

Основной проблемой, с которой сталкиваются исследователи при изучении культивируемого разнообразия метаногенных архей в ММО и других постоянно холодных экосистем является то, что в связи с суровыми температурными условиями скорость биохимических реакций и биологических процессов становится настолько низкой, что микробиологические методы становятся недостаточно чувствительными для исследования.

Таблица 5. Метаногены из холодных природных и техногенных экосистем

Метаноген	Расположение места выделения	<i>In situ</i> T (°C)	T _{опт} , °C	T _{max} , °C	T _{min} , °C
<i>Methanogenium frigidum</i>	Озеро Эйс, Антарктида	1-2	15	18	0
<i>Methanogenium marinum</i>	Skam Bay, Аляска	1-4	25	25	5
<i>Methanococcoides burtonii</i>	Озеро Эйс, Антарктида	1-2	23	28	-2
<i>Methanococcoides alaskense</i>	Skam Bay, Alaska	1-6	24-26	28	5
<i>Methanosarcina lacustris</i>	Озеро Соппен, Швейцария	5	25	35	1
<i>Methanosarcina baltica</i>	Skam Bay, Alaska	1-6	21	28	5
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	Мерзлые почвы	+15 - - 25	28	45	5
' <i>Methanolobus psychrophilus</i> '	Цинхай-Тибетское плато	4	18		

На сегодняшний день имеются немногочисленные сведения об археях, выделенных из постоянно холодных мест обитания, и, в основном, это метаногены (Franzmann *et al.*, 1992, 1997; Kotelnikova *et al.*, 1998; Lomans *et al.*, 1999; Simankova *et al.*, 2001; Von Klein *et al.*, 2002; Shlimon *et al.*, 2004; Kendall *et al.*, 2007) (табл. 5).

Штамм SMA-21^T, принадлежащий новому виду *Methanosarcina solidgelidi*, был выделен из многолетнемерзлых отложений острова Самойловский. Метаносарцина является мезофильным нейтрофильным хемоавтотрофом, но в качестве источников для метанобразования использует H₂+CO₂, метанол и ацетат. Согласно филогенетическому анализу, ближайшим родственником для штамма SMA-21^T является *Methanosarcina mazei* S-6^T (Mah and Kuhn, 1984).

В работе Жанга с соавторами (Zhang *et al.*, 2008) есть сведения о новом психрофильном метаногене '*Methanobus psychrophilus*' из болот Цинхай-Тибетского плато, использующем в качестве субстрата для метаногенеза метанол, однако, в списке с валидированными названиями (<http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>) он отсутствует. Тем не менее, для этого метаногена был секвенирован геном и проанализирован транскриптом генов, чувствительных к холоду, путем сравнения геномных перестроек для культуры, выращенной при 18°C (оптимальная температура) и при 4°C. Обнаруженные различия были проверены с использованием количественного анализа ПЦР в реальном времени. Результаты показали, что, как и у антарктического метаногена *Methanococcoides brutonii*, у штамма R15 гены метаногенеза, биосинтеза и синтеза белка регулировались снижением температуры. Тем не менее, РНК-полимеразный комплекс был активирован при холоде, как и кластер генов для предполагаемого экзосомного комплекса, что указывает на то, что распад РНК, опосредованный экзосомой, может ускоряться при снижении температуры. Штамм R15 обладал восемью белковыми семействами для детоксикации кислорода, включая как специфичную для анаэробов супероксидредуктазу (SOR), так и типичную для аэробов систему удаления кислорода супероксиддисмутаза (SOD) - каталазу, что подразумевает более высокую окислительную толерантность исследуемого штамма. (Chen *et al.*, 2012).

3.5.4 Метаногенные археи - модельные объекты для астробиологических исследований

Перспективы открытия жизни вне Земли инициируют исследования земных объектов, условия существования в которых подобны таковым на планетах криогенного типа. Чтобы быть удобной моделью для экзобиологии, такие объекты должны являться изолированными экосистемами с постоянно отрицательной температурой. Для существования жизни абсолютно необходима свободная вода. При отрицательных температурах она может находиться в них только в высокоминерализованном состоянии. Всем этим требованиям удовлетворяют криопэги (Gilichinsky *et al.*, 2003). Как следствие, возник интерес к микроорганизмам рассолов в вечной мерзлоте, поскольку они (если будут обнаружены) могут рассматриваться как потенциальные обитатели внеземных экосистем, а их физиолого-биохимические особенности - как стратегии выживания на планетах криогенного типа.

Изучая микроорганизмы в таких экстремальных условиях как экосистемы Арктики, мы приближаемся к пониманию того, какие жизненные формы могут населять планеты криогенного типа. Вечная мерзлота представляет собой природное хранилище древних микроорганизмов, которые при постоянных отрицательных температурах сохраняют жизнеспособность намного дольше, чем в любых известных местах обитания, а обнаруженные в криосфере Земли жизнеспособные клетки, возможно, представляют собой аналоги бывшей или нынешней жизни внеземных экосистем. Одним из самых привлекательных объектов для поиска жизни является Марс, земной моделью экосистемы которого является криобиосфера и сохранившиеся в ней микроорганизмы.

Первыми, кто выдвинули идею использования модели земной мерзлоты для решения проблем экзобиологии, были Кэмерон и Морелли (Cameron and Morelli, 1974). В настоящее время известно, что верхние 20-50 см поверхности Марса представляют собой слой рыхлый сухой мерзлый грунт, а последующий метр определяется как вечная мерзлота (Rummel *et al.*, 2014). Результаты исследований, полученные с орбитального аппарата «Марс Одиссей», показали, что на этой планете есть обширные залежи льда (Boynnton *et al.*, 2002; Demidov *et al.*, 2008; Cull *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014), что представляет перспективу для определения внеземной жизни, в частности психрофильной.

С 2003 года появляются сообщения об обнаружении в атмосфере Марса метана (Mumma *et al.*, 2003; Formisano *et al.*, 2004; Krasnopolsky *et al.*, 2004; Mumma *et al.*, 2009). Из-за фотохимической диссоциации метан может находиться в тропосфере всего несколько сотен лет, а его наличие в атмосфере Марса указывает на постоянное пополнение (Hitchcock and Lovelace, 1967). Это может происходить благодаря метаболизму микроорганизмов, либо быть следствием абиотических процессов (вулканы, и т.д.).

Метаногенные археи рассматривались в качестве модельных организмов для возможных форм жизни еще до того, как метан был обнаружен в атмосфере Марса (Иванов, Леин, 1991; Boston *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 2000). Метаногены это анаэробные автотрофные микроорганизмы, использующие CO₂ и H₂ для продукции метана, отдельные штаммы могут выдерживать низкое давление и высушивание (Kral *et al.*, 2011), а также низкие температуры (Reid *et al.*, 2006), а именно такие условия характерны для Марса. Кроме того, был проведен ряд исследований, направленный на проверку выживаемости метаногенных архей в моделируемых условиях Марса (Kendrick and Kral, 2006; Altheide and Kral, 2008), и результаты показали, что метаногены способны приспосабливаться и привлекать для метаболизма дополнительные источники энергии (Chastain and Kral, 2010). Изучение влияния ультрафиолета проверяли на ряде метаногенных штаммов различных температурных предпочтений (Sinha *et al.*, 2018; Mickol *et al.*, 2018).

Таким образом, анаэробные хемолитотрофные психротолерантные метаногенные микроорганизмы с их способностью усваивать углекислый газ и другие неорганические соединения являются достаточно подходящими моделями для форм жизни, которые могут существовать в замороженных подповерхностных средах на Марсе, где недоступны органические соединения, нет свободного кислорода и крайне низкое количество незамерзшей воды.

Заключение по обзору литературы

В настоящее время наблюдается большой интерес и бурное развитие исследований в области микробной экологии холодных экосистем. Для того, чтобы получить представление о разнообразии и экологической функции микробных популяций в холодных экосистемах, применяются микробиологические методы как связанные с культивированием, так и культурально-независимые молекулярные методы.

Исследования структуры сообществ показывают широкий спектр разнообразия и указывают на то, что психрофильные и психроактивные микроорганизмы представляют собой большой массив новых и еще не культивируемых таксонов. Развитие улучшенных методов отбора образцов и выделения культур психрофилов может привести к увеличению получения жизнеспособных клеток и новых таксонов анаэробных представителей бактерий и, особенно, архей с уникальными свойствами.

В связи с ростом интереса к астробиологии, интенсивность исследований микробной экологии в разнообразных постоянно мерзлых отложениях, таких как древняя вечная мерзлота и лед, значительно возросла в последние годы. Психроактивные автотрофные

метанобразующие археи, населяющие полярные области, рассматриваются как прототип для возможной жизни на криогенных планетах Солнечной системы.

Несмотря на все описанные в литературе достижения, много вопросов относительно существования микробных сообществ в вечной мерзлоте и адаптации клетки к отрицательной температуре остаются открытыми. Все еще открыт вопрос о метаболическом статусе микроорганизмов *in situ*. И хотя на чистых культурах и смешанных популяциях убедительно показано, что сама по себе отрицательная температура не является препятствием для осуществления метаболизма, все же условия экспериментов в этих работах далеки от естественных.

Поскольку большая часть нашей планеты (80-90% по разным оценкам) находится круглогодично при температурах не выше 5°C, то процессы, происходящие в холодных экосистемах, опосредуются адаптированными к холоду микроорганизмами. Для предсказания направлений тех или иных процессов приобретает большое значение знание физиологии осуществляющих их микроорганизмов. Несмотря на важность проблемы, имеются лишь отрывочные сведения, касающиеся распространения метаногенных архей в постоянно холодных местах обитания и их биологических свойствах. Частично это можно объяснить медленными скоростями роста этих микроорганизмов.

С развитием методов молекулярной биологии стал доступным анализ геномов психроактивных микроорганизмов и метагеномов нативных сообществ ММО. Однако в виду недостаточности выборки пока трудно делать обобщения о распространении архей в этих экосистемах.

Несомненно, интерес ко всем этим проблемам неуклонно растет, о чем свидетельствует все большее количество публикаций, посвященных данной тематике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования в работе использовали:

1. Образцы многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (Россия), отобранные Д.А. Гиличинским (лаборатория криологии почв, ИФХиБПП РАН) и долины реки Маккензи, Канада (69° 22' N 135° 00' W), переданные нам Д.А. Гиличинским.
2. Образцы криопэггов, отобранные в районе о. Якутское (Колымская низменность (69°50' с.ш., 159°30' в.д.) Д.А. Гиличинским в 1999 году; на п-ове Варандей (68°50' с.ш., 58°15' в.д.), отобранные в 2004 г. А.В. Холодовым (лаборатория криологии почв, ИФХиБПП РАН); на п-ов Ямал, отобранные в 2013 году Н.Э. Демидовым (лаборатория криологии почв, ИФХиБПП РАН).
3. Накопительные и чистые культуры бактерий и архей, выделенные нами из этих образцов. Для сравнительного анализа использовали штаммы микроорганизмов *Pshychrobacter glacincola* DSM 12194^T, *Methanobacterium bryantii* М.о.Н^T ВКМ В-1629^T, *Methanosarcina mazei* S-6^T ВКМ В-1636^T, *Sphaerochaeta globosa* DSM 22777^T, *S. pleomorpha* DSM 22778^T, *Celerinatantimonas diazotrophica* S-G2-2^T DSM 18577^T, *Desulfovibrio idahonensis* CY1^T DSM 15450^T, *D. desulfuricans* В-1799^T, *Clostridium frigoris* ВКМ В-2735^T, *C. lacusfryxellense* VKM В-2736^T, *C. bowmanii* VKM В-2737^T, *C. psychrophilum* VKM В-2738^T, *C. estertheticum* VKM В-2739^T, *P. arcticus* 273-4^T, *P. cryohalolentis* K5^T, *P. immobilis* DSM 7229^T, *P. nivimaris* DSM 16093^T, *Carnobacterium funditum* DSM 5972^T, *C. alterfunditum* DSM 5970^T, полученные из ВКМ или DSMZ.

4.2. Районы исследования и отбор проб

Колымская низменность. Образцы многолетнемерзлых пород были отобраны в результате экспедиций в тундровую зону Колымской низменности (рис. 1, Приложение 1). Криопэги тундровой зоны Колымской низменности были обнаружены в районе озера Якутское (69°50' с.ш., 159°30' в.д.) и приурочены к морскому горизонту мощностью 20 м, выделяемому в коньковскую свиту конца среднего плейстоцена (рис. 2, Приложение 1). Отложения свиты характеризуются хлоридно-натриевым засолением. Ярусное залегание, разное гидростатическое давление и различная минерализация криопэггов указывают на их линзовидное распространение. Морской горизонт, включающий линзы криопэггов, венчает позднеплейстоценовый синкриогенный озерно-аллювиальный ледовый комплекс. В нем

присутствуют полигонально-жильные льды, наличие которых доказывает, что ни ледовый комплекс, ни подстилающий его горизонт морских отложений впоследствии не протаивали. Микробиологические исследования проводили в четырех из десяти скважин, вскрывших криопэги. Анаэробные микроорганизмы изучали в скважинах 14/99 и 15/99.

Полуостров Варандей. Исследования проводили на Варандейском полуострове (68°50' с.ш., 58°15' в.д.), который расположен на северо-востоке Большеземельской тундры, на южном побережье Баренцева моря, в Ненецком автономном округе. Территория полуострова за время плейстоцена и голоцена претерпела ряд морских трансгрессий и регрессий, что обусловило сложное строение верхних толщ многолетнемерзлых пород: «пестрота» геокриологических условий и разнообразие типов мерзлотной обстановки, осложненной охлажденными засоленными породами, а также напорными криопэгами. Мерзлота на участке исследований была трех типов: верхний слой новообразованной (т.е. промерзшей в течение последних 5-6 тыс. лет) мерзлоты мощностью 4-5 м (рис. 2, 1, Приложение 1); слой охлажденных водонасыщенных засоленных осадков (рис. 2, 2, Приложение 1); реликтовая мерзлота плейстоценового возраста (рис. 2, 3, Приложение 1). Последняя также может содержать линзы криопэгов. Температура верхнего мерзлого горизонта в летнее время не превышает -2°C в пределах прибрежной отмели и -3°C на морской террасе. В целом участок характеризуется среднегодовой температурой пород -2...-5°C.

Верхний горизонт мерзлоты был вскрыт двумя скважинами 3 и 10 в пределах отмели и двумя скважинами 21 и 25 на морской террасе (рис. 2, Приложение 1). Разрез представлен песками прибрежно-морского генезиса с линзами илистых отложений. Все отложения засолены и содержали метан (в песках 0.2-12 мл/кг, в илистых отложениях до 22 мл/кг). Поэтому можно предположить, что их формирование происходило в анаэробных условиях. Межмерзлотный горизонт напорных подземных вод был вскрыт всеми скважинами на глубинах 4-6 м в пределах отмели и 4-8 м на морской террасе. Изучение анаэробов проводили в скважине 21.

Криопэги полуострова Ямал. Полуостров Ямал расположен в области сплошного распространения ММО, которое нарушается лишь на 5% территории сквозными таликами под озерами Нейто, Сохонто, Ямбуто, Модымалто и Хаданто. Бованенковское газовое месторождение (70°29'00" с.ш., 68°00'00" в.д.) расположено на западе центрального Ямала (бассейны рек Надояха и Мордыяха) в области сплошного распространения многолетнемерзлых пород, залегающих сразу под сезонно-талым слоем. До глубин 220-310 м мерзлую почву повсеместно подстилает горизонт переохлажденных засоленных почв. В

устье р. Ярояха на глубинах от 5 до 120 м в многолетнемерзлых толщах встречаются криопэги (рис. 3, Приложение 1). Среднегодовая температура мерзлых толщ колеблется от (-2) до (-4)°С. Вода криопэгов характеризовалась нейтральными значениями рН, криопэги 2У и 3У имели хлоридно-натриевое засоление, а общая минерализация колебалась от 14.6 до 77.2 г/л.

4.2.1 Гидрохимические характеристики криопэгов

Общая минерализация криопэгов Колымской низменности составила 120-163 г/л. Рассол характеризовался хлоридно-натриевым засолением и нейтральным рН (табл. 6).

Общая минерализация криопэгов, обнаруженных на полуострове Варандей, составила от 6 до 18 г/л. Столь низкая соленость вод объясняется, по всей видимости, распределением горизонта за счет инфильтрации атмосферных осадков и поверхностных вод по подоцерным таликам. По составу, воды преимущественно хлоридно-натриевые, и только в одной скважине отмечены сульфатно-натриевые (табл. 6).

Таблица 6. Гидрохимические характеристики криопэгов*.

№ Скважины	Глубина отбора, м	рН	Минерализация, г/л	Катионы				Анионы		
				K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
Колымская низменность										
14/99	28	7.4	163.03	0.8	48.8	1.6	8.0	0.59	99.4	3.84
15/99	25	7.3	156.86	0.8	47.4	1.2	7.7	0.54	97.3	1.92
16/99	11	7.9	120.79	0.8	36.3	0.8	6.0	0.37	74.6	1.92
17/99	17	7.2	152.65	0.8	46.0	1.2	7.4	0.45	93.4	3.4
Полуостров Варандей										
03/04	4	7.1	10.6	0.06	3.28	0.36	0.12	5.68	0.48	0.62
10/04	3.5	7.8	6.24	0.06	1.485	0.32	0.06	2.13	0.05	2.14
21/04	9	7.4	9.30	0.65	0.03	1.01	0.96	2.12	3.61	0.92
25/04	3.5	6.8	18.66	0.21	4.36	1.08	0.28	5.79	4.99	1.95
Полуостров Ямал										
1У	120.0	7.9	14.6	0.12	0.196	2.0	2.04	0.46	9.59	0.19
2У	5.0	7.4	56.2	0.85	16.35	0.52	2.38	1.02	31.2	2.88
3У	12.5-20.0	7.5	77.2	0.41	22.68	1.04	3.79	1.71	47.2	0.31

*-анализ выполнен И.С. Куприной (ИГЭ РАН им. Е.М. Сергеева, Москва); жирным шрифтом отмечены скважины, в которых исследовали разнообразие анаэробов.

Методика стерильного отбора проб при колонковом бурении мерзлых пород станком УКБ-12/25 детально отработана в этой же лаборатории и подробно описана (Гиличинский *и др.*, 1989; Shi *et al.*, 1997). Отобранные пробы хранились замороженными до начала анализов. Исследование разнообразия некультивируемых архей проводилось в северо-западном секторе арктической тундры 68°37"N, 161°21'54"E (устье реки Колымы), расположенном за пределами нефтегазовых площадей. Отбор проб воды из скважин, вскрывающих криопэги, осуществляли с помощью гидрохимического батометра ПЭ 1105 в предварительно стерилизованные бутылки объемом 500 мл.

Изучаемая территория является прибрежной низменностью, для которой характерны мягкое лето (средняя температура июля составляет 10°C) и очень холодная зима (температура падает ниже -40°C), а среднегодовая температура варьирует от -11 до -13°C. Образцы были отобраны в ходе экспедиции в 2007 году из скважины 04-07 глубиной 23 метра. Колонковое бурение и отбор проб осуществлялись согласно ранее отработанной методике (Shi *et al.*, 1997). Каждый образец состоял из 5-6 частей весом от 1.5-2.0 г, взятых с разных участков керна. До начала анализов все образцы хранились в замороженном состоянии. Концентрация CH₄ была измерена хроматографически после выравнивания газовой фазы (Rivkina *et al.*, 2007). Общий органический углерод был определен, как описано ранее (Шмелев *и др.*, 2013). На рис. 8 отмечены места отбора проб для выделения общей ДНК и точно определенный возраст мерзлых пород.

Когда бур попадал в линзу криопэга, образцы воды отбирали стерильной бутылкой, вставленной в оборудование. Это не исключало попадание небольшого количества грунтов, через которые проходил бур. Чтобы доказать незначительный вклад микроорганизмов, попавших в воду криопэгов из грунтов, проводили эксперименты с включением в биомассу меченой глюкозы, которые подробно описаны (Gilichinsky *et al.*, 2003; Gilichinsky *et al.*, 2005).

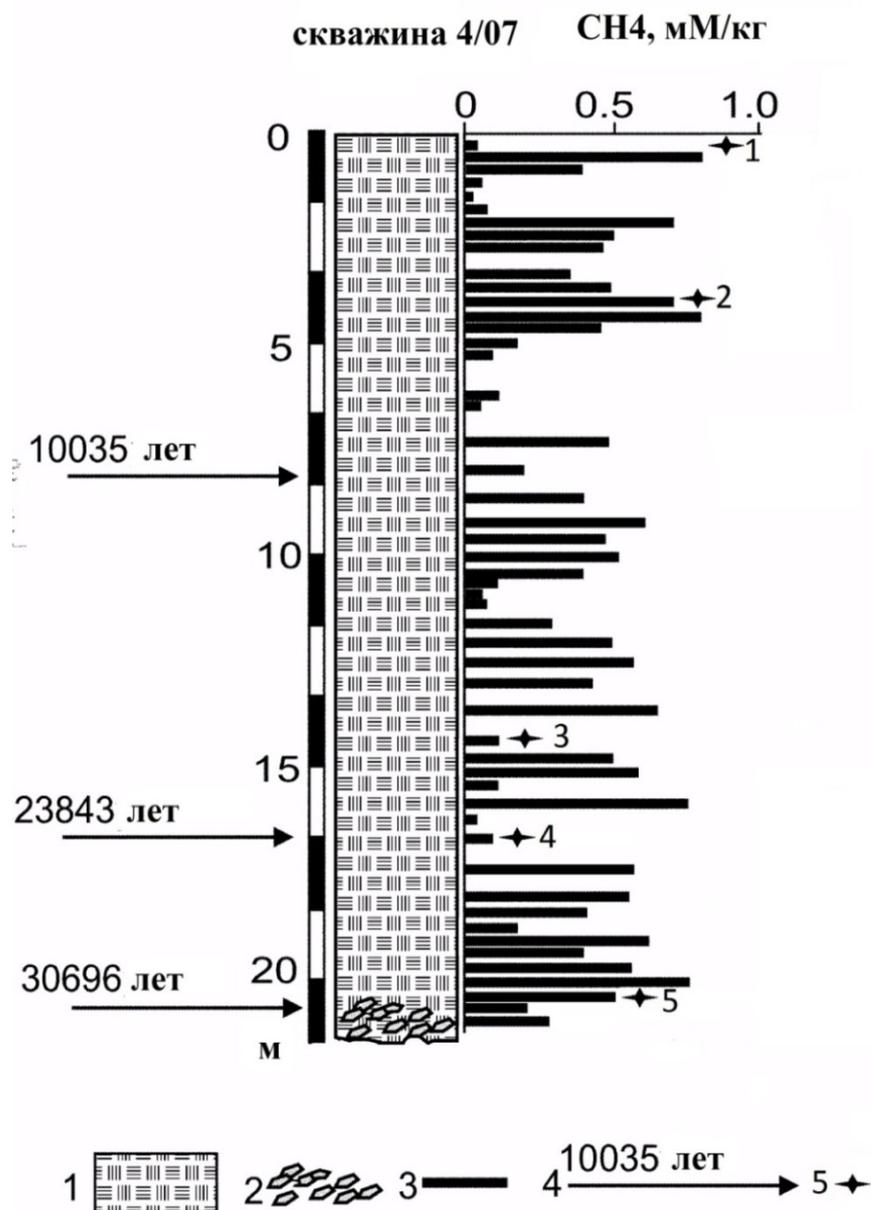


Рисунок 8. Характеристика многолетнемерзлых отложений, использованных в молекулярно-экологических исследованиях. Условные обозначения: 1 – супесчаные; 2 – песок с гравием; 3 – метан; 4 – радиоуглеродное датирование; 5 – исследуемые образцы

4.3 Микроорганизмы

4.3.1 Методы учета численности

Общее количество микроорганизмов определяли методом прямого счета по Разумову (1962). Последовательно фильтровали 3-5 мл рассола криопэггов через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры перед употреблением трехкратно кипятили (по 15 минут) в дистиллированной воде. Фильтрацию вели на фильтрах Зейтца.

После фильтрации фильтры выдерживали в парах формалина. Для подсчета бактерий проводили окраску фильтров 4% эритрозин, приготовленном на 5% растворе карболовой кислоты. Окраску вели в течение 3-х часов. Затем многократно промывали, последовательно перенося их на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, до слабо-розовой окраски. Высушивали на воздухе и готовили препараты для микроскопирования. Вырезали кусочек фильтра и помещали его на предметное стекло в каплю кедрового масла, сверху наносили еще одну каплю масла и покрывали препарат покровным стеклом.

Счет микроорганизмов проводили с помощью сетки Гаженко, просчитывая в 20 полях зрения палочковидные, кокковидные и прочие формы. Общее количество микроорганизмов определяли по формуле:

$$X = e \times 10^6 \times d / a \times b \times c,$$

где X - количество бактерий в 1 мл; e - площадь фильтра; 10^6 - переводной коэффициент мм^2 в мкм^2 ; d - сумма бактерий, просчитанных во всех полях зрения; a - площадь окулярного счетного микрометра в мм^2 ; b - объем профильтрованной воды в мл; c - число просчитанных полей зрения.

Численность жизнеспособных анаэробных бактерий различных физиологических групп определяли методом предельных разведений. Температура инкубирования 5-6 и 15-18°C. Подсчет производили на 14-е и 28-е сут. при 15-18°C и на 45-е и 60-е сут. при 5-6°C.

4.3.2 Состав сред, получение накопительных и чистых культур

Численность **анаэробных органотрофных прокариот** с бродильным типом метаболизма определяли на среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 0.7; K_2HPO_4 - 0.7; NH_4Cl - 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1; NaCl - 1.0; аскорбат Na - 1.0; глюкоза - 2.0; пептон - 2.0. О наличии роста судили по увеличению оптической плотности в области 600 нм.

Численность **сульфатредукторов** определяли на среде, содержащей (г/л): KH_2PO_4 - 0.33; KCl - 0.33; NaCl - 2.0; NH_4Cl - 0.33; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.33; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.33; Na_2SO_4 - 4.0; раствор микроэлементов 141 - 10 мл; раствор витаминов по Волину (Wolin et al., 1963) - 5 мл; лактат - 2.0. О росте судили по появлению сероводорода, который определяли спектрофотометрически.

Метаногены учитывали по приросту метана на среде 141 (DSMZ 141) с ацетатом (2 г/л) и $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80:20).

Для определения численности **ацетогенов** использовали среду следующего состава: NH_4Cl – 1.0; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; NaCl – 0.9; K_2HPO_4 – 0.4; дрожжевой экстракт – 0.1; триптон – 3.0; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; цистеин – 0.4; раствор микроэлементов 141 – 10 мл; NaHCO_3 – 0.2; резазурин – 0.001; бромэтансульфоновая кислота – 2.0. Субстрат $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80:20). Присутствие ацетатобразующих бактерий устанавливали по наличию ацетата в культуральной жидкости, который определяли хроматографически.

Для **получения накопительных культур** штаммов 14D1, 14F и A121 использовали среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.7; K_2HPO_4 – 0.7; NH_4Cl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; NaCl – 1.0; аскорбат Na – 1.0; глюкоза – 2.0; пептон – 2.0. В пробирки Хангейта рабочим объемом 15 мл добавляли 10 мл среды и 1 мл воды криопэга (штаммы 14D1 и 14F) или метаногенной ассоциации, полученной из ММО Канады (штамм A121), инкубировали в темноте при температуре 5°C в течение 3 месяцев до появления бактериальной мутности ($\text{OD}_{600} \sim 0.6$).

Чистые культуры штаммов **14D1^T**, **14F^T** и **A121^T** поддерживали и культивировали на жидкой среде, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 0.7; K_2HPO_4 – 0.7; NH_4Cl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; NaCl – 5.0; аскорбат Na – 1.0; глюкоза – 2.0. Колонии получали на той же среде с добавлением 20 г/л агара “Difco” (США) на чашках Петри, помещенных в анаэроостаты “Oxoid” (Великобритания). Все пересевы осуществляли шприцами. Штаммы хранили в лиофилизированном состоянии, а также путем пересева каждые 2 месяца.

Накопительные культуры СББ штаммов **B15** и **K3S** получали на среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.33; KCl – 0.33; NaCl – 2.0; NH_4Cl – 0.33; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.33; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.33; Na_2SO_4 – 4.0; резазурин 0.002; раствор микроэлементов SL-10 – 10 мл; раствор витаминов (Wolin et al., 1963) – 5 мл. После стерилизации добавляли восстановитель $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ – 0.25 г/л и лактат 2 г/л.

Чистые культуры штаммов **B15^T** и **K3S^T** поддерживали на среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.33; KCl – 0.33; NaCl – 2.0; NH_4Cl – 0.33; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.33; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.33; Na_2SO_4 – 4.0; раствор микроэлементов SL-10 – 2 мл; раствор витаминов (Wolin et al., 1963) – 5 мл. После стерилизации добавляли 25 мл 10%-ного раствора NaHCO_3 и 2.5 мл 25%-ного раствора HCl на 1 л среды. Культуру сохраняли путем пересева каждые 2 месяца на эту же среду. *Desulfovibrio idahonensis* CY1^T DSM 15450^T, который использовали в качестве референтного штамма, выращивали на среде DSMZ 63.

Для выделения чистой культуры бактериального спутника штамм **GLS2** использовали метод десятикратных разведений (Hungate, 1969) на модифицированной среде SM (Leadbetter & Breznak, 1996) следующего состава (г/л): NaCl – 1.0; KCl – 0.5; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.4;

CaCl₂×2H₂O - 0.1; NH₄Cl - 0.3; KH₂PO₄ - 0.2; Na₂SO₄ - 0.15; ксилоза - 20 мМ; дрожжевой экстракт “Difco” (США) - 1.0; NaHCO₃ - 0.5; микроэлементы SL7 (Widdel & Pfennig, 1981) - 1 мл; раствор витаминов 141 - 1 мл. Стерильные растворы карбоната, витаминов и ксилозы добавляли в среду из стерильных стоковых растворов перед посевом. рН доводили до 7.2-7.3 с помощью 10%-ного раствора NaHCO₃. Культивирование осуществляли при 30°С.

Для получения накопительной культуры **С7** из пробы ямальского криопэга использовали следующую среду (г/л водопроводной воды): MnSO₄×5H₂O – 0.1; MgSO₄×7H₂O – 0.1; NaCl – 40.0; NH₄Cl – 0.5; Na аскарбат – 1.0; глюкоза – 2.0; пептон – 2.0; раствор микроэлементов 141 – 10 мл, рН 7.0-7.2. Выделение чистой культуры осуществляли в анаэробных условиях в пробирках Хангейта. Чистую культуру штамма **С7^T** культивировали на среде того же состава, но содержащую 80 г/л NaCl и 0.5 г/л MgSO₄×7H₂O, рН 6.0 - 6.2.

Для культивирования штаммов **1pS**, **2pS** и **3ps** использовали жидкую среду следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ – 11.2; KH₂PO₄ – 4.0; NH₄Cl – 2.0; NaCl – 4.0; MgCl₂×6H₂O – 0.1; CaCl₂ ×2H₂O – 0.01; FeSO₄×7H₂O – 0.005; ацетат натрия – 10.0; раствор микроэлементов 141 - 10 мл. Культивирование штаммов проводили при температуре 18-20°С, рН среды 7.2, в колбах Эрленмейера со 100 мл среды под ватными пробками, в течение 5 суток. Все выделенные факультативно-анаэробные штаммы поддерживали путем пересева каждые 4 месяца в пробирках со скошенным мясо-пептонным агаром и хранили в холодильнике при 4°С. Состав агаризованной среды (г/л): мясной бульон – 10; пептон 10; NaCl – 5; агар – 15.

Для получения накопительных **метаногенных** культур 10 г образца многолетнемерзлых отложений помещали в 30-мл стеклянные флаконы, куда добавляли 5 мл основной минеральной среды, а также ацетат (10 мМ) или H₂+CO₂ (80:20) в качестве источников углерода и энергии. Культивирование проводили при 6, 15 и 20°С. Периодически во флакон добавляли 1 мл восстановленной среды и задували смесью H₂+CO₂ (80:20), создавая давление 1 атм.

Для выделения и поддержания метаногенных архей руководствовались анаэробной техникой (Hungate, 1969) и использовали основную среду следующего состава (г/л): K₂HPO₄ - 0.29; KH₂PO₄ - 0.29; NaCl, 1.0; MgCl₂×6H₂O, 0.2; NH₄Cl, 1.0; CaCl₂×2H₂O, 0.1; цистеин-НCl, 0.5; витамины, 5 мл и микроэлементы, 10 мл (Balch *et al.*, 1979). Одиночные колонии были получены методом десятикратных разведений (Hungate, 1969) на основной среде, содержащей 2 г/л агара “Difco” (США). Чистые культуры метаногенов получали методом

предельных разведений с добавлением в основную среду пенициллина (2000 мг/л) и стрептомицина (1000 мг/л).

Чистую культуру штамма JL01 получали и поддерживали на среде (г/л): K_2HPO_4 - 0.29; KH_2PO_4 - 0.29; NaCl, 1.0; $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.2; NH_4Cl , 1.0; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.1; цистеин-HCl, 0.5; раствор витаминов 141 - 5 мл и раствор микроэлементов 141 - 10 мл, казаминовые кислоты - 1.0. *Methanosarcina mazei* S-6^T ВКМ В-1636^T выращивали на среде, аналогичной среде для штамма JL01, культивирование осуществляли при 37°C. В качестве источника углерода в среду для штаммов JL01 и S-6^T добавляли 120 мМ метанола или 20 мМ ацетата натрия.

Штаммы M2^T и *M. bryantii* М.о.Н^T ВКМ В-1629^T, используемый в сравнительных экспериментах, культивировали на среде MB, содержащей (г /л): ацетат натрия, 0.05; $(NH_4)_2SO_4$, 0.45; K_2HPO_4 , 0.29; KH_2PO_4 , 0.18; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.12; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.06; NaCl, 5.0; раствор витаминов 141 - 10 мл; раствор микроэлементов - 10 мл; резазурин, 0.001; цистеин-HCl, 0.25; $Na_2S \times 9H_2O$, 0.25. Растворы цистеин-HCl и сульфида добавляли из стерильных растворов перед посевом, доводили pH и задували H_2/CO_2 (80:20). Культивирование осуществляли при 37°C.

Штамм МК4^T выращивали на среде, содержащей (г/л): ацетат натрия - 0.05; $(NH_4)_2SO_4$ - 0.45; K_2HPO_4 - 0.29; KH_2PO_4 - 0.18; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.12; $CaCl_2 \times 2H_2O$ - 0.06; NaCl - 5.0; раствор витаминов 141 - 10 мл; раствор микроэлементов 141 - 10 мл; резазурин - 0.1; цистеин HCl - 0.25; $Na_2S \times 9H_2O$ - 0.25.

Раствор микроэлементов 141 содержал (г/л дистиллированной воды): нитрилтриуксусная кислота – 1500; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 3.00; $MnSO_4 \times H_2O$ - 0.50; NaCl - 1.00; $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0.10; $CoSO_4 \times 7H_2O$ - 0.18; $CaCl_2 \times 2H_2O$ - 0.10; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ - 0.18; $CuSO_4 \times 5H_2O$ - 0.01; $KAl(SO_4)_2 \times 12H_2O$ - 0.02; H_3BO_3 - 0.01; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ - 0.01; $NiCl_2 \times 6H_2O$ - 0.01; $Na_2SeO_3 \times 5H_2O$ - 0.30 мг; $Na_2WO_4 \times 2H_2O$ 0.40 мг. Сначала растворяли нитрилтриуксусную кислоту в небольшом количестве воды и доводили pH до 6.5 с использованием раствора KOH, затем добавляли минеральные соли. Конечный pH 7.0.

Раствор витаминов 141 содержал (мг/л дистиллированной воды): биотин - 2.0; фолиевая кислота - 2.00; пиридоксин-HCl - 10.0; тиамин-HCl $\times 2H_2O$ - 5.0; рибофлавин - 5.0; никотиновая кислота - 5.0; D-Са-пантеноат - 5.0; витамин B₁₂ - 0.10; *n*-аминобензойная кислота - 5.0; липоевая кислота - 5.0.

4.3.3 Методы контроля чистоты культур

Контроль чистоты полученных культур осуществляли визуально при микроскопировании препаратов живых клеток на микроскопе Люмам И-2, оснащенный фазово-контрастным устройством.

Среда для обнаружения гетеротрофных бактерий в культурах сульфатредукторов и метаногенов содержала, (г/л): пептон – 1; дрожжевой экстракт – 5; глюкоза – 2; NaCl – 1.

4.3.4 Микроскопические методы исследования*

Морфологию клеток культур изучали с помощью световых микроскопов Люмам И-2 (Россия), Zeiss Axiostar plus (Германия), микроскопа Nikon Eclipse Ci (Япония) с камерой Jenoptic Prog Res SpeedXT^{core}5, а также электронного микроскопа JEM 100 (Япония), используя негативно окрашенные препараты, ультратонкие срезы и криосколы.

Негативное контрастирование клеток проводили, обрабатывая разбавленную клеточную суспензию 3% раствором фосфоровольфрамной кислоты, рН 5.0 или 1% раствором молибденовокислого аммония, рН 7.0. Время окрашивания 3-5 минут при комнатной температуре.

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов проводили по Рейндольсу (Reynolds, 1963). Клетки фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида, осаждали, промывали дважды 0.05 М какодилатным буфером (рН 7.4) и дофиксировали 1%-ным раствором OsO₄ на какодилатном буфере в течение 2 часов при 4°C. Препарат обезвоживали в серии спиртовых растворов возрастающей концентрации и заливали в смолу Spurr. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-3 и окрашивали 1%-ным раствором уранил-ацетата.

Поверхностные структуры клеток изучали методом скалывания в замороженном состоянии. Криофиксацию препаратов проводили в пропане, охлажденном до температуры жидкого азота. Скалывание вели в вакуумно-напылительной установке JEE-4C (JEOL, Япония). После скола на препарат под углом наносили платиноуглеродную смесь, а перпендикулярно к поверхности напыляли углерод в виде графита. Реплику очищали хромовой кислотой, промывали дистиллированной водой и наносили на сетку.

Линейные размеры клеток определяли на микрофотографиях с помощью линейки объект-микронметра с учетом увеличения микроскопа и фотоувеличителя.

* - проводили совместно с к.б.н. Н.Е. Сузиной и к.б.н. Т.Н. Абашиной

4.3.5 Определение параметров роста микроорганизмов

Параметры роста исследуемых штаммов определяли на основной среде для каждого штамма по оптической плотности (OD) при 600 нм на спектрофотометре «Spectol-221» (Германия), по образованию метана в газовой фазе, измеренного на газовом хроматографе (метаногены), либо по образованию сульфида (сульфатредукторы) и ацетата (ацетогены). Предварительно, были проведены эксперименты по определению соотношения образованного продукта и клеточного урожая бактерий и архей (Щербакова *и др.*, 1991).

Вес сухой биомассы определяли по разности веса фильтра “Millipore “ (Германия) с диаметром пор 0.22 мкм до и после нанесения биомассы. Для этого через фильтр, высушенный при 80°C до постоянного веса, фильтровали 5 мл клеточной суспензии. Фильтр высушивали до постоянного веса при тех же условиях.

Время удвоения клеток (t_d) определяли как время, за которое оптическая плотность или количество сульфида увеличиваются вдвое и рассчитывали по формуле (Powell, 1983):

$$t_d = \frac{(t_1 - t_0) \lg 2}{\lg b_1 - \lg b_0}$$

где t_1 и t_0 -- времена, при которых измерялся параметр роста b_1 и b_0 , соответственно.

Скорость роста рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

Экономический коэффициент (Y) оценивали в виде отношения количества сухой биомассы к количеству потребленного субстрата, выраженного в процентах.

4.3.6 Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов

Влияние температуры исследовали в диапазоне от -5 до 50°C, солёности - от 0 до 100 г/л NaCl. Культивирование при отрицательной температуре проводили в криобане, заполненной этиленгликолем. Влияние pH среды определяли на основной среде при оптимальной температуре и солёности, культивируя клетки при различных значениях pH. При необходимости значения регулировали с помощью добавления стерильного 1 М HCl, 10%-ного раствора NaHCO₃ или 8%-ного Na₂CO₃ для получения требуемого конечного значения pH.

Способность штаммов использовать различные субстраты в качестве источников углерода и энергии определяли на соответствующей основной среде при оптимальных

значениях температуры, солености и рН, добавляя сахара (2 г/л), органические кислоты (2-4 г/л), спирты (120 мМ), метиламины (2 г/л), полисахариды (1 г/л), Н₂:СО₂ (80:20). Все эксперименты проводили в трех повторностях и подтверждали двумя пересевами.

Действие антибиотиков определяли путем переноса аликвоты культур (5 мл) на свежую среду, содержащую один из антибиотиков, и сравнивали рост данных культур с контролем. Окраску по Граму проводили согласно методике (Buck, 1982; Murray *et al.*, 1994).

Для определения энзиматической активности штаммов использовали набор ферментативных экспресс-тестов API ZYM («BioMerieux», Франция) и руководствовались инструкциями производителя. Фенотипические тесты (наличие каталазы, оксидазы, гидролиз крахмала, желатины и т.д.) проводили по методикам, подробно изложенным в Методах бактериологии (Герхард *и др.*, 1984)

4.4. Аналитические методы

4.4.1 Определение летучих жирных кислот, спиртов и газов

Содержание **жирных кислот, спиртов и метана** определяли на газовом хроматографе Pye-Unicam 304 (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором.

Для определения **метана** использовали стеклянную колонку (длина 1 м, внутренний диаметр 2 мм), заполненную Порапаком Q, 80-100 меш (Fluka, Германия). Температура колонки, инжектора и детектора были 90, 150 и 180°C, соответственно. Газом-носителем был азот со скоростью потока 20 мл/мин.

Жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират, изобутират, валерат, гексаноат, гептаноат) определяли с использованием стеклянной колонки (2м×2мм), заполненной неопентилгликольсукцинатом (20 вес.%) на хромосорбе W/AW-DMCS 100-200 меш (Fluka, Германия). Температуру колонки повышали со скоростью 6°C/мин от 80 до 175°C. Температура инжектора 150°C, детектора 180°C. Газ – носитель – СО₂. Перед определением рН пробы доводили до 4 ортофосфорной кислотой.

Спирты определяли на стеклянной колонке (2м × 2 мм), заполненной Порапаком QS 80-100 меш (Fluka, Германия) в изократическом режиме при температуре колонки, инжектора и детектора 100, 120 и 170°C, соответственно. В качестве газа-носителя использовали азот со скоростью потока 20 мл/мин.

Водород определяли на газовом хроматографе Shimadzu 8A (Япония) с детектором по теплопроводности. Температура детектора и колонки составляла 100 и 60 °С.

4.4.2 Определение лактата

Определение лактата осуществляли ферментативным способом по восстановлению НАД⁺ лактатдегидрогеназой при окислении лактата в пируват (Hohorst, 1970).

Реактивы: 0.15 М гидразин-глициновый буфер (pH 9.0; 0.1 М раствор НАД⁺; лактатдегидрогеназа – 20 U/мл.

Ход определения. Пробу (0.5 мл), гидразин-глициновый буфер (1.5 мл) и НАД⁺ (0.3 мл) помещали в кювету, перемешивали и через 3 мин измеряли поглощение при 360 нм на «Spocol-221» (Германия) (E_1). После этого вносили 0.02 мл лактатдегидрогеназы, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и измеряли поглощение E_2 . Экстинкцию, обусловленную содержанием лактата, определяли по разности E_2 и E_1 . Калибровочный график строили с использованием стандартных растворов, содержащих от 0 до 120 мг/л лактата.

4.4.3 Определение глюкозы

Количественное определение глюкозы проводили по методу Шомодьи – Нельсона (Nelson, 1944).

Реактивы: Реактив Шомодьи состоял из смеси реагентов А и В в соотношении 25:1. Реагент А содержал, (г/л): Na_2CO_3 – 25.0; NaHCO_3 – 20.0; Na_2SO_4 – 200.0; калий-натрий виннокислый ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}\times 4\text{H}_2\text{O}$) – 25.0. Реагент В - 15%-ный раствор $\text{CuSO}_4\times 5\text{H}_2\text{O}$, подкисленный 2 каплями концентрированной серной кислоты.

Реактив Нельсона содержал: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\times 4\text{H}_2\text{O}$ – 25.0, дистиллированной воды - 450 мл, концентрированной серной кислоты - 21 мл, к которым добавляется $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\times 7\text{H}_2\text{O}$ – 3.0 г, растворенных в 25 мл воды.

Ход определения: к 1 мл пробы добавляли 1 мл реактива Шомодьи. После перемешивания, нагревания в течение 15 мин на водяной бане и охлаждения добавляли 1 мл реактива Нельсона. Пробу снова перемешивали, доводили объем до 10 мл дистиллированной водой и измеряли экстинкцию раствора при длине волны 660 нм и длине оптического пути 1 см на спектрофотометре «Spocol 221» (Германия).

4.4.4 Определение сероводорода

Сероводород определяли по методу, предложенному Pachmaur (Cline, 1969). Метод основывается на том, что H_2S прежде всего, связывается в виде ZnS , который длительное время устойчив по отношению к воздуху. При добавлении очень кислого раствора N,N-диметил-1,4-фенилендиаммонийной соли H_2S освобождается и реагирует с диамином, образуя

восстановленную бесцветную форму метиленовой сини. Последняя окисляется в голубую форму Fe^{3+} , концентрацию которой определяют спектрофотометрически.

Реактивы: 2.4% раствор $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; диаминовый реактив: к 600 мл дистиллированной воды приливали 200 мл концентрированной H_2SO_4 и охлаждали, затем добавляли 2 г N,N-диметил-1,4 фенилен-диаммоний-дихлорида и доводили до 1000 мл дистиллированной водой; 10% -ный раствор $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$.

Ход определения. Пробу, содержащую от 0 до 24 мМ сульфида, помещали в мерную колбу (объем 100 мл) с 20 мл раствора ацетата цинка, добавляли 50 мл дистиллированной воды и 10 мл диаминового реактива. После встряхивания колбы вносили 0.5 мл раствора железоаммонийных квасцов, перемешивали, оставляли на 10 минут. Затем доводили объем реакционной смеси дистиллированной водой до 100 мл. Экстинкцию образца определяли на спектрофотометре «Spacol-221» (Германия) при 670 нм. Контролем служил образец без сульфида. Для получения калибровочной кривой пользовались раствором сульфида натрия известной концентрации.

4.4.5 Определение белка биомассы

Содержание белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). К аликвоте предварительно гидролизованной кипячением с NaOH пробы (100 мкл) добавляли 1 мл раствора кумасси G-250 и определяли экстинкцию при длине волны 595 нм. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

4.4.6 Определение десульфовиридина, цитохромов и менахинонов

Для определения десульфовиридина снимали абсолютный спектр поглощения бесклеточного экстракта и регистрировали пик поглощения при 630 нм или использовали метод Постгейта (Postgate, 1959). В качестве положительного и отрицательного контроля использовали *Desulfovibrio desulfuricans* В-1799^T и *Escherichia coli* К-12, соответственно.

Состав цитохромов определяли спектрофотометрически по положению максимумов поглощения на спектрах, регистрируемых на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония) при длинах волн 552, 523 и 420 нм.

Получение бесклеточного экстракта: бактериальную культуру анаэробно осаждали при 12000g в течение 10 мин при 4°C, промывали в 400 мл фосфатного буфера (pH 6.7) и ресуспендировали в 10-12 мл фосфатного буфера. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Великобритания) в течение 1 мин (процедуру повторяли 20 раз), центрифугировали 20 минут при 12000 g и проверяли супернатант на наличие цитохромов. Анализ состава цитохромов проводили, используя следующие виды спектров:

- СО-дифференциальный: препарат, восстановленный дитионитом натрия + СО против восстановленного дитионитом;
- абсолютный: восстановленный дитионитом препарат против раствора латекса такой концентрации, чтобы компенсировать поглощение препарата при 600 нм.

Хиноны дыхательной цепи определяли согласно процедуре Collins (1985).

4.4.7 Определение ионов двухвалентного железа

Метод определения ионов Fe^{2+} основан на экстракции ионов феррозином, который образует с двухвалентным железом стабильный комплекс (Lovley et al., 1986).

Реактивы: 0.1% раствор феррозина в 50 мМ N-2-оксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислоте (HEPES), pH 7.0.

Ход определения: 0.5 мл культуральной жидкости помещали в 3 мл раствора феррозина. Через 1 мин измеряли поглощение при 562 нм на «Specol-221» (Германия).

4.4.8 Анализ жирнокислотного состава клеток* и типа пептидогликана

Липиды экстрагировали из клеточной биомассы (3-5 мг сухих клеток) методом кислого метанолиза в смеси 0.4 мл 1.2 Н HCl - метанол при 80°C в течение 3 часов. Метилвые эфиры жирных кислот и другие липидные компоненты экстрагировали дважды 200 мкл гексана. Экстракт высушивали, обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида при 80°C в течение 15 мин для образования триметилсилильных эфиров гидроксикислот. Пробу реакционной смеси в 2 мкл анализировали с помощью хроматографической системы GC-MS HP-5973 («Hewlett-Packard», США). Для проведения процесса и получения данных руководствовались инструкциями к прибору. Разделение осуществляли на капиллярной колонке (25×0.25мм), покрытой химически связанной метилсиликоновой неподвижной фазой HP-5ms Hewlett-Packard (толщина слоя 0.2 мкм). Хроматографию проводили при температурном программном режиме от 130 до 320°C со скоростью 5°/мин. Обработка данных выполнялась с помощью стандартных программ системы GC-MS. Чувствительность системы составляла 0.01 нг метилстеарата. Каждое вещество было определено по его масс-спектру в соответствии с базами данных NIST.

Для определения типа пептидогликана клеточные стенки выделяли, как описано Schleifer & Kandler (1972), затем их гидролизовали с 6М HCl при 105°C в течение 6 часов. Количественный состав аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе LC 600 (Biotronic). * - определение проводили совместно с д.б.н Г.А. Осиповым и к.х.н А. Новиковым

4.4.9 Анализ липидного состава клеток

Липиды экстрагировали из лиофилизированных клеток (приблизительно 100 мг), выращенных до стационарной фазы роста в соответствии с методикой (Minnikin et al., 1979). Отделение липидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии на ТСХ-пластинах Silica Gel 60F (Merck). Для обнаружения использовали 5%-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле (Minnikin et al., 1979). Фосфолипиды определяли молибденовым синим, гликолипиды - λ -нафтолом.

4.4.10 Определение азотфиксирующей активности

Способность штамма $C7^T$ фиксировать азот тестировали с использованием метода восстановления ацетилена, предложенного Стюартом с соавторами (Stewart et al., 1968). Штамм $C7^T$ выращивали в трех повторностях в пробирках Хангейта в среде с цитратом, не содержащей азота, в анаэробных условиях до средней экспоненциальной фазы роста. После этого добавляли ацетилен до конечной концентрации около 10% (об./об.) в газовой фазе. Культуру инкубировали при 18°C на шейкере (200 об/мин) в течение 48 часов. Количество полученного этилена измеряли на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Россия), оснащенный пламенно-ионизационным детектором. Для оценки уровня загрязнения ацетилена этиленом использовалась контрольная пробирка без культуры.

4.4.11 Определение антифризной активности

Определение антифризной активности исследуемых культур основывалось на визуальном определении прозрачности кристаллов после быстрого замораживания клеточных гомогенатов и культуральной жидкости, а также микроскопирования препаратов при понижении температуры с использованием модуля, снабженного стеклянным столиком с контролем температуры (Model THM 600, Linkham Scientific Instruments, UK).

4.4.12 Определение структуры полисахаридов клеточных стенок *Psychrobacter* spp.

Для определения структур полисахаридов клеточных стенок биомассу штаммов $2pS^T$, $3ps K5^T$ *Psychrobacter* spp. наращивали на ферментерах Анкум – 210 (Россия), осаждали и лиофилизировали. Полисахариды экстрагировали раствором фенола, структуру соединений устанавливали методами ПМР, ЯМР и масс-спектрометрии, подробно описанными Кондаковой с соавторами (Kondakova et al., 2012; 2012a; 2012b).

4.4.13 Определение липазной активности

Липазную активность определяли с использованием Lipase Assay Kits (Bio Assay Systems, UK) в клеточных экстрактах бактерий и архей согласно инструкциям производителя.

4.5. Эксперименты по влиянию перхлоратов, УФ-облучения и вакуумирования на рост метаногенов

Действие перхлоратов на рост метаногенов оценивали путем изменения скорости образования метана из $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ и ацетата (Shcherbakova *et al.*, 1999). Метаногенные штаммы выращивали в 150 мл флаконах при оптимальных условиях для каждого штамма (Shcherbakova *et al.*, 2015).

Выращенные культуры метаногенов были посеяны в 30-мл стеклянные анаэробные флаконы, содержащие 10 мл соответствующей для каждого штамма среды с 30 мМ ацетата или смесью газов $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80:20, при 200 кПа). После продувки флаконов N_2 , штаммы инкубировали при соответствующих температурах. На следующий день среду анализировали на наличие ацетата и H_2 , которые затем снова добавляли в среду. Перхлораты добавляли в среду с исследуемыми штаммами в концентрациях 1, 5 и 10 мМ, за исключением контроля. Затем флаконы продували азотом и возобновляли инкубирование. Два последующих дня процедуру повторяли. Через 1 ч инкубирования проверяли изменение концентрации метана в газовой фазе во всех исследуемых флаконах. Концентрацию метана измеряли в течение двух дней с интервалом 12 - 24 часа. Скорость метаногенеза определяли по графику зависимости образования метана от времени.

Концентрацию перхлоратов определяли на хроматографе IC-2010 (Токио, Япония). Элюирующий раствор содержал 10 мМ NaHCO_3 , 8 мМ Na_2CO_3 и 30% CH_3CN . Температура колонки составляла 40°C, скорость потока – 1.2 мл/мин. Для определения перхлоратов использовали 1 мл метаногенной культуры, которую центрифугировали при 12000 об/мин.

Ингибирующую активность выражали в процентах от контрольной скорости (%СК). Процент ингибирования (%ИК) рассчитывали следующим образом: $\% \text{ИК} = 100 - \% \text{СК}$. Концентрации перхлоратов, вызывающие 20, 50 и 80%-ное ингибирование метаногенеза, обозначались как IC_{20} , IC_{50} , и IC_{80} , соответственно.

Облучение ультрафиолетом (УФ) проводили в ИМБП РАН. Биомассу метаногенов анаэробно переносили в кварцевые пробирки и подвергали облучению по схеме, представленной в табл. 7.

Таблица 7. Дозы УФ облучения ($\lambda = 254$ нм) полученные метаногенами при испытании.

	Дни эксперимента						
	Первый день			Второй день			Третий день
Длительность облучения, мин	10	15	25	30	30	30	30
Доза облучения, мДж/см ²	11886	17829	28715	35658	35658	35658	35658
Суммарная доза облучения, мДж/см ²	11886	29715	59430	95088	130746	166404	202062

Для экспериментов с **вакуумированием** выращивали биомассу метаногенов, осаждали ее и переносили на полимерное волокно накрученное на тефлоновые палочки, которые вставляли в завинчивающиеся тефлоновые пробирки. Вакуумирование в течение 15 мин проводили на приборной базе НПО Лавочкин.

4.6 Анализ внутриклеточного полисахарида *Clostridium algariphilum*

Количественное определение полисахарида. Для определения содержания внутриклеточного полисахарида клетки собирали путем центрифугирования, дважды отмывали в 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7.0), разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе «MSE» (Англия). Из полученного гомогената удаляли белок путем добавления трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 1.5% и последующего центрифугирования при 9000 g в течение 20 минут. Количественно полисахарид определяли в супернатанте антроновым методом (Herbert *et al.*, 1971). Антроновый реактив готовили следующим образом. 500 мг антрона и 10 г тиомочевины растворяли в 980 мл 72% серной кислоты. Нагревали на водяной бане при температуре 80-85°C до максимального растворения веществ. Всегда использовали свежеприготовленный реактив.

Ход определения: К 100 мкл пробы добавляли 1 мл антронового реактива. Пробирки кипятили в течение 15 мин на водяной бане, помещали в эксикатор со льдом. Фотометрировали при 620 нм. Стандартом служил раствор глюкозы в 0.15% бензойной кислоте.

Получение чистого препарата полисахарида. Чистый полисахарид получали из депротеинизированного клеточного гомогената по методу Стамса (Stams *et al.*, 1983). Полисахарид осаждали этанолом, добавляя его до конечной концентрации 50%.

Центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок подсушивали в термостатной комнате при 37°C.

Определение способности полисахарида окрашиваться раствором Люголя. Полисахарид окрашивали следующим образом: 10 мг очищенного полисахарида растворяли в 2 мл дистиллированной воды. Затем проводили гидролиз амилоглюкозидазой (1,4- α -D-глюканглюкогидролаза, К.Ф.3.2.1.3) при 37°C в течение 2 часов. В кювету вносили 0.1 мл пробы, добавляли 0.2 мл раствора Люголя (0.2 % иода в 2% растворе KI). Определяли величину экстинкции при 495 нм гидролизованного и негидролизованного препарата. Контролем служил 10-кратноразбавленный раствор Люголя.

Определение элементного состава полисахарида. С, Н, N определяли на приборе для элементного анализа модель 1106 («Carlo Erba Strumentazione», Италия). Ортофосфаты определяли по Новикову (Новиков *и др.*, 1990).

Гидролиз и определение состава мономеров. Ферментативный гидролиз полисахарида осуществляли с помощью амилоглюкозидазы (1,4- α -D-глюканглюкогидролаза, К.Ф.3.2.1.3) и β -амилазы (1,4- α -D-глюканмальтогидролаза, К.Ф. 3.2.1.2). При этом к водному раствору полисахарида добавляли 1 мг/мл фермента и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Кислотный гидролиз проводили в 2.5 N серной кислоте при 120°C в течение 30 мин. Идентификацию продуктов гидролиза проводили методом жидкостной хроматографии высокого давления на анализаторе углеводов «Biotronic LC 2000» (Германия).

4.7 Молекулярно-генетические методы исследования

4.7.1. Выделение и очистка геномной ДНК

ДНК из образцов многолетнемерзлых отложений весом приблизительно 10 г выделяли с помощью наборов Power Soil DNA (USA) согласно протоколу производителя.

Выделение и очистку хромосомной ДНК чистых культур бактерий и архей проводили модифицированным методом Мармура (Marmur, 1961). Сырую биомассу ресуспендировали в TE-буфере (10 mM Трис-HCl pH 8.0; 1 mM ЭДТА), доведя OD₆₀₀ до 1.0. К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 2-5 мг/мл и инкубировали 30 мин при 37°C на водяной бане. После этого добавляли протеиназу К до конечной концентрации 10-20 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37°C. К суспензии добавляли 20% раствор SDS до конечной концентрации 1-2% и инкубировали 60 мин при 56°C. Затем проводили 3 цикла замораживания при -40°C и оттаивания при 65°C. Далее к раствору добавляли 5 M NaCl и 10% ЦТАБ в 0.7M NaCl до конечной концентрации 1M и 1%, соответственно. Лизат выдерживали 20 мин при 65°C, добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин.

Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1), перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, экстрагировали равным объемом хлороформа и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин.

Для осаждения ДНК из отобранной верхней фазы добавляли 3 объема охлажденного 96% этанола и 0.1 объем 3М ацетата калия, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ДНК промывали последовательно 80% и 96% растворами этанола и подсушивали на воздухе. ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Добавляли раствор РНК-азы до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 37°C. Повторяли экстракцию смесью фенола-хлороформа. ДНК из раствора осаждали этанолом или изопропанолом как описано выше. Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoPhotometer®P-Class (Implen, Германия).

4.7.2. Амплификация 16S рРНК и функциональных генов

Амплификацию генов осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь содержала (25 мкл): ДНК-матрицы, 10 нг; MgCl₂, 2.5 mM; каждого дНТФ, 0.25 mM (Fermentas, Литва); Taq - полимеразы, 1×буфер (Fermentas, Литва); каждого праймера, 0.1 мкМ (табл. 8).

Режим ПЦР (температура-время): с праймерами 340F2 и 932R: 94°C – 3 мин.; 45 ×(94°C – 45 с; 50°C – 45 с; 72°C – 120 с); 72°C – 7 мин; с праймерами ML-f и ML-r: 94°C – 5 мин.; 40 ×(94°C – 40 с; 55°C – с; 72°C – 90 с); 72°C – 7 мин; с праймерами 27f и 1492r: 94°C - 5 мин, 30 ×(94°C - 30 с, 55°C - 30 с, 72°C - 2 мин); 72°C - 10 мин; с праймерами MCR1R и MCRf: 95°C - 3 мин, 28 ×(95°C - 30 с; 60°C - 15 с; 72°C - 1 мин); 72°C - 2 мин.

ПЦР “в реальном времени” (qPCR) проводили на амплификаторе АНК32 (Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала: 1×реакционная смесь “Синтол” 041-0604006 SYBR Green I (Синтол, Россия); 10 нг ДНК-матрицы; по 0.1 мкМ каждого праймера (Евроген/Синтол, Россия) и 1.5 mM MgCl₂. Для набора праймеров DSR1F/DSR4R использовали следующий температурно-временной режим: начальная денатурация ДНК при 94°C – 5 мин; последующие 40 циклов - денатурация 94°C – 30 с, отжиг праймеров 55°C – 20 сек, элонгация ДНК при 72°C – 2 мин. В качестве калибровочного стандарта использовали десятикратные разведения геномной ДНК *D. arcticus* B15^T. Для *D. arcticus* число копий гена *dsrAB* вычисляли исходя из числа клеток бактерий, взятых для выделения ДНК и подсчитанных методом прямого счета.

Таблица 8. Праймеры, использованные в работе.

Праймер	Ген-мишень	Последовательность (5'-3')	Ссылка
340F2	16s рРНК архей	CCCTAYGGGGYGCASCAGGC	Murakami <i>et al.</i> , 2012
932R	16s рРНК архей	GCYCYCCCGCCAATTCMTTTA	Murakami <i>et al.</i> , 2012
27f	16s рРНК бактерий	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492r	16s рРНК бактерий	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
ML-f	<i>mcrA</i>	GGTGGTGTMGGATTCACACART AYGCWACAGC	Luton <i>et al.</i> , 2002
ML-r	<i>mcrA</i>	TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT	Luton <i>et al.</i> , 2002
MCR1R	<i>mcrA</i>	ARCCADATYTGRTCRTA	Hales <i>et al.</i> , 1996
MCRf	<i>mcrA</i>	TAYGAYCARATHTGGYT	Springer <i>et al.</i> , 1995
DSR1F	<i>dsrAB</i>	AC(C/G)CACTGGAAGCACG	Wagner <i>et al.</i> , 1998
DSR4R	<i>dsrAB</i>	GTGTAGCAGTTACCGCA	Wagner <i>et al.</i> , 1998

Для набора праймеров MCRf/MCR1R использовали следующий температурно-временной режим: 20 мин при 37°C для снижения загрязнения продуктов ПЦР; начальная денатурация ДНК при 94°C – 3.5 мин; последующие 40 циклов - денатурация 94°C – 30 с, отжиг праймеров 55°C – 30 сек, элонгация ДНК при 72°C – 30 с. В качестве калибровочного стандарта использовали десятикратные разведения геномной ДНК *D. arcticus* B15^T. Число копий гена *mcrA* вычисляли исходя из числа клеток архей *M. bryantii* М.о.Н., взятых для выделения ДНК и подсчитанных методом прямого счета.

По калибровочной кривой определяли начальное количество ДНК, вносимое в реакционную смесь. Концентрацию ДНК измеряли на NanoPhotometer®P-Class (Implen, Германия). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором.

4.7.3 Создание клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcrA*

Создание клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcrA* проводили при помощи клонирования соответствующих ПЦР продуктов, очищенных 2% агарозным гелем KANTO HC (Kanto kagaku, Japan) с использованием набора QIAEX II Gel (Qiagen, Hilden, Germany), в вектор *E. coli* HST08 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) с помощью набора TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Частичный секвенс *nifH* гена в штамме $C7^T$ определяли с использованием пары праймеров F1 (5'-TAYGGIAARGGIGGIATIGGIAARTC-3') и *nifH-3r* (5'-TTGTTGGCIGCRTASAKIGCCAT -3') согласно протоколу Федорова с соавторами (2008). Из штамма был получен продукт амплификации ожидаемого размера (418 п.о.), очищен и секвенирован.

4.7.4 Определение геномных последовательностей

Для секвенирования геномов клетки штаммов метаногенов $M2^T$ и $MK4^T$ были выращены на соответствующих средах в лаборатории анаэробных микроорганизмов (ИБФМ РАН). Из биомассы нами была выделена геномная ДНК, профессору Cadillo-Quiroz Н. (Cornell University, Ithaca, NY). Проф. Cadillo-Quiroz Н. курировал секвенирование геномов штаммов $M2^T$ и $MK4^T$ и помещение драфтов геномов в GenBank под NZ_JQJK00000000.1 и NZ_JQKN01000001.1, соответственно. Секвенирование и аннотация геномов штаммов $GLS2^T$ и $K3S^T$ проводились в рамках проекта “Genomic Encyclopedia of Type Strains, Phase III (KMG-III)” в DOE Joint Genome Institute в США. Для анализа геномов мы использовали базы данных NCBI (BLASTP), платформу PATRIC и программу GGDC 2.0. Величину сходства полногеномных последовательностей (Average nucleotide identity, ANI) рассчитывали с использованием алгоритма, основанного на ‘Blast+’ на JSpeciesWS сервере (Richter *et al.*, 2015).

4.7.5 Секвенирование

Секвенирование нуклеотидных последовательностей, полученных в работе, проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН и в Национальном институте полярных исследований (Токио, Япония) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDyeTM Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК 3730 Applied Biosystems.

4.7.6. Статистический анализ последовательностей

Последовательности клонов со сходством более чем 98% относили к одинаковым филотипам. Покрытие (C) рассчитывали по формуле: $C=1-(n_1/N)$, где n_1 – количество уникальных филотипов (встречаемых 1 раз), а N – общее число анализируемых клонов (Good, 1953; Chao, 1987). Индексы видового разнообразия Шеннона (H) и доминирования Симпсона (D) определяли с использованием программного обеспечения “Shannon and Chao 1 index RBD” (Cole *et al.*, 2013).

4.7.7. Филогенетический анализ

Для поиска в GenBank нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и функциональных генов использовали программу BLAST базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности выравнивали в программе ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), объединяли в таксономические единицы в программе cd-hit (Li and Godzic, 2006), проверяли на наличие химер в программе Pintal (Ashelford *et al.*, 2005). На основе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) были построены филогенетические дендрогаммы с применением метода «neighbor-joining» и «minimum evolution» (Saitou *et al.*, 1987). Для определения таксономического положения полученных последовательностей использовали RDP Classifier v 2.5 (Wang *et al.*, 2007).

Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов JL01^T, GSL2^T, МК4^T, M2^T, С7^T, 14D1^T, 14F^T, В15^T, К3S^T, А121^T депонированы в GenBank под номерами AF519802, JN944166, EF016285, DQ517520, FJ039852, AY117755, EF570920, DQ296030. KJ739728, DQ296031, соответственно. Последовательности *mcrA* гена штамма JL01 и *nifH* гена штамма С7 депонированы под учетными номерами GenBank KY368727 и JF701923, соответственно. В эту же базу данных помещены последовательности клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcrA* под номерами KF049010-KF049107.

4.7.8 Определение и расчет содержания Г+Ц пар в ДНК*

Содержание Г+Ц пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Mesbah *et al.*, 2011). ДНК диализовали в течение суток против 1000-кратно превосходящего объема 0.1×SSC буфера (0.15M NaCl; 0.015 M Na₃C₆H₅O₇×5.5H₂O, pH 7,0) при 4°C при медленном перемешивании на магнитной мешалке. Температуру плавления ДНК определяли на спектрофотометре DU800 Beckman Coulter в термостатируемой ячейке при температурах от 60 до 95°C со скоростью нагрева 0.5°C в минуту. Измерения проводили в трех повторностях.

4.7.9. ДНК-ДНК гибридизация*

ДНК диализовали против 2×SSC, как описано выше, и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Великобритания) на льду до получения фрагментов длиной 500-700 п.н. Реакцию гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora с соавт. (Rossello-Mora *et al.*, 2011). ДНК-ДНК гибридизацию *in silico* осуществляли с применением программного обеспечения GGDC 2.0 на сайте DSMZ.

*определение Г+Ц состава и ДНК-ДНК реассоциацию проводили совместно с к.б.н. Аriskиной Е.В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 5. РАЗНООБРАЗИЕ АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ В ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЕ И КРИОПЭГАХ

Постоянное воздействие отрицательных температур и основные физико-химические параметры делают мерзлоту одной из стабильных и сбалансированных экосистем (Vorobyova *et al.*, 1997). Это определяет необходимость рассматривать традиционные физико-химические параметры мерзлоты как абиотические, которые способствуют сохранению жизнеспособности и обеспечивают формирование микробных сообществ, реализующих неизвестные способы физиологической и биохимической адаптации к длительному переохлаждению. До наступления «геномной эры» о разнообразии микроорганизмов судили по результатам классических микробиологических методов, связанных с культивированием или прямым счетом под микроскопом. Так, общее количество бактерий, определенное путем прямого счета составило 10^5 - 10^6 для проб антарктических грунтов (Cowan *et al.*, 2002; Gilichinsky *et al.*, 2007), 10^7 для проб арктических грунтов Канады (Steven *et al.*, 2004) и 10^3 - 10^8 кл/г для проб арктических грунтов Сибири (Rivkina *et al.*; 1998; Gilichinsky, 2002). Количество жизнеспособных бактерий, определенное посевами на агаризованные богатые среды, варьировало от 0 до 10^8 кл/г.

Первые данные о численности анаэробных групп прокариот были получены Е.М. Ривкиной (Rivkina *et al.*, 1998). Эти результаты свидетельствовали о том, что низкий окислительно-восстановительный потенциал вечной мерзлоты способствует выживанию бактерий и архей, приспособленным к жизни без кислорода. Но вопрос о разнообразии анаэробов в ММО оставался открытым.

5.1 Численность анаэробных прокариот различных физиологических групп в вечной мерзлоте и криопэгах

Исследования жизнеспособных микроорганизмов криопэгов в толщах вечной мерзлоты Арктики были инициированы Давидом Абрамовичем Гиличинским в конце 20 века. Это был период, когда геномные подходы в микробной экологии практически не применялись или требовали больших объемов проб, содержащих малые количества микробной биомассы. Для характеристики этой уникальной ниши мы использовали классические микробиологические методы определения численности бактерий и архей. Лишь для характеристики проб криопэгов полуострова Ямал в 2013 году частично были применены молекулярно-биологические приемы.

5.1.1 Колымская низменность

Общая численность микроорганизмов в криопэгах, определенная путем прямого счета, составила $2.3-6.6 \times 10^7$ кл/мл. Эти результаты сравнимы с данными, полученными для поверхностных водных систем (Vorobyova *et al.*, 1997) и мерзлых осадков (Gilichinsky, 2002). Численность жизнеспособных аэробных бактерий, 80-95% которых были представлены грамположительными аэробными непигментированными палочками и кокками, колебалась от 0 до сотен тысяч клеток в 1 мл рассола (Гиличинский *и др.*, 2003). Максимальное количество таких бактерий было отмечено при температуре культивирования 5°C, и эта особенность была характерна для проб из всех четырех исследованных скважин.

Численность анаэробных прокариот различных физиологических групп была определена в скважинах 14/99 и 15/99 и составила от десятков (ацетогены) до нескольких миллионов (сульфатредукторы) клеток в мл. Максимальная численность отмечалась при температуре культивирования 5°C, а при 18-20°C она падала на 1-3 порядка. Количество органотрофов было максимальным при 5°C, тогда как при 18-20°C их было на порядок меньше (скважина 14/99) или не обнаруживалось (скважина 15/99). Метаногены высевались лишь на среде с ацетатом в качестве единственного источника углерода и энергии при 5°C (табл. 9). На галофильных средах, содержащих 100 г/л NaCl, численность СВБ не изменялась, другие виды анаэробов не обнаруживались. Исключение составляли ацетогены, численность которых при 15-18°C уменьшалась на порядок.

В исследуемых пробах рассола Колымских криопэгов Бакерманс с соавторами обнаружили 17 фило типов бактерий, близкородственных родам *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, *Frigoribacterium*, *Subterricola*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Paenibacillus* и *Bacillus* (Bakermans *et al.*, 2003). Штаммы родов *Psychrobacter*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus* и *Rhodococcus* ранее часто обнаруживали и выделяли из арктической и антарктической морской воды (Brambilla *et al.*, 2001; Christner *et al.*, 2001; Mergaert *et al.*, 2001). В дальнейшем штамм K5, выделенный из воды криопэгов Колымской низменности, был описан как новый вид *P. cryohalolentis* (Bakermans *et al.*, 2006).

Нам удалось выделить в чистую культуру три штамма *Psychrobacter* sp., характеризующихся способностью к росту в анаэробных условиях, а также два штамма спорообразующих анаэробных бактерий.

Таблица 9. Численность анаэробных жизнеспособных прокариот различных физиологических групп в образцах криопэггов

№ скважины	Соленость среды, г/л	Численность микроорганизмов, кл/мл								
		Общий счет*	Анаэробные органотрофы		СВБ**		Ацетогены		Метаногены	
			5-6°C	15-18°C	5-6°C	15-18°C	5-6°C	15-18°C	5-6°C	15-18°C
Колымская низменность										
14/99	5.0	2.3-6.6×10 ⁷ *	2×10 ²	2×10 ²	2×10 ⁶	2×10 ²	10	0	1×10 ²	0
	100.0		0	0	2×10 ⁶	2×10 ¹	0	10	0	0
15/99	5.	2.3-6.6×10 ⁷ *	2×10 ²	0	2×10 ⁵	2×10 ³	1×10 ²	0	0	0
	100.0		0	0	2×10 ⁶	0	0	0	0	0
Полуостров Варандей										
21	5.0	8.2×10 ⁸	10 ⁵	10 ⁵	10 ²	10	0	0	10	10
	35.0		5×10 ³	10 ²	10	50	0	0	0	0
Полуостров Ямал										
У1	15.0	8.2×10 ⁸	2×10	2×10 ⁸	2×10 ⁴	2×10 ³	0	10	0	0
У2	40.0	4.2×10 ⁷	2×10 ³	2×10 ⁵	0	10	0	2×10 ²	2×10 ²	0
У3	80.0	3.2×10 ⁶	2×10 ⁴	2×10 ⁵	2×10 ³	2×10 ³	2×10	2×10	2×10	0

* - методом окрашивания с DAPI; ** - сульфатвосстанавливающие бактерии

Методически трудно получить образцы криопэггов без попадания в рассол некоторой части мерзлого грунта скважины. Для того, чтобы убедиться в том, что мы учитываем аборигенную анаэробную микрофлору криопэггов, нами был проведен подсчет численности таких же групп анаэробов в образцах мерзлой породы, находящейся над исследованными криопэгами (табл. 10.) в скважинах 14/99 и 15/99. Полученные результаты показали, что при температуре 5-6°C были обнаружены десятки клеток негалофильных СВБ и метаногенов, а также единичные клетки органотрофов на пресной среде при температуре 15-18°C. Можно предположить, что в криопэг могли попасть только метаногены, которые обнаруживались в таком же количестве, как в криопэгах.

Таблица 10. Численность анаэробных микроорганизмов в пробах вечной мерзлоты над криопэгами.

№ скважины	Глубина, м	Температура инкубации, °С	Численность микроорганизмов, кл/г			
			Органо-трофы	СВБ**	Ацетогены	Метаногены
14/99	27.35-27.40	4-5	0	1.2x10	0	2.1x10 ²
		18-20	1.8x10	0.3x10	0	0
		4-5*	0	0	0	0
		18-20*	0	0	0	0
15/99	24.15-24.20	4-5	0	2.3x10 ²	0	1.5x10 ²
		18-20	4.8x10	2.8x10 ²	0	0
		4-5*	0	0	0	0
		18-20*	0	0	0	1.9x10

* посевы на галофильные среды, соответствующие физиологическим группам микроорганизмов;

**СВБ –сульфатвосстанавливающие бактерии.

5.1.2 Варандейский полуостров

Вода криопэггов из четырех скважин Варандейского полуострова была проанализирована на наличие в ней аэробных бактерий при различной температуре инкубации. Численность аэробных гетеротрофных бактерий, определенная с использованием универсальной среды 5/5, варьировала от десятков тысяч до десятков миллионов клеток в 1 мл.

Учет количества аэробных бактерий в образцах из различных скважин при трех температурах показал, что численность бактерий, определенная при 37 °С, на 1-3 порядка ниже (1.1×10^3 - 5.5×10^5 кл/мл), чем при 5 и 20°C (4.5×10^6 - 3.5×10^7 и 8×10^5 - 4×10^7 , соответственно). Кроме этого, мы определили численность бактерий в образце из 21-й скважины при температуре, близкой к естественной температуре местообитания (-2°C). Она составила 6.3×10^5 кл/мл. Колонии, выросшие через месяц инкубации, были двух типов. Первый - кремевые, полупрозрачные, бугристые с неровным краем, 5-7 мм в

диаметре (штамм п-2). Микроскопия препаратов показала, что клетки штамма п-2 представлены грамотрицательными подвижными палочками. Второй тип колоний - белые выпуклые округлые с ровным краем, 3-5 мм в диаметре, были представлены неподвижными коккобациллами, одиночными и в парах, размером 2-3×3.5-4 мкм (штамм к-2) и морфологически очень похожие на клетки штаммов *Psychrobacter* sp., выделенные нами ранее из криопэгов Колымской низменности. Нами была определена частичная последовательность гена 16S рРНК (400-500 нуклеотидов) штаммов п-2 и к-2, филогенетический анализ которого показал принадлежность штамма п-2 к роду *Pseudomonas*, кластеру флуоресцирующих псевдомонад, в то время как штамм к-2 действительно оказался представителем рода *Psychrobacter* (Печерицына и др., 2007).

В пробах из 21 скважины была определена общая численность микроорганизмов путем прямого счета на фильтрах при окраске эритрозином, а также численность различных физиологических групп анаэробных бактерий. Численность микроорганизмов, определенная путем прямого счета, составила 3.5×10^8 кл/мл и это значение на порядок выше, чем для криопэгов Колымской низменности. Как и в случае с аэробами, количество жизнеспособных бактерий, определенное при 5°C, практически не отличалось от количества, определенного при 20°C (табл. 9). Сульфатредукторы были представлены сотнями клеток в 1 мл образца, метаногены - десятками. Ацетогенных бактерий выявлено не было. Учет на средах с повышенным содержанием NaCl показал присутствие галотолерантных (или галофильных) представителей соответствующих групп бактерий в количестве, примерно на порядок меньшем, чем количество бактерий, полученное при посеве на пресные среды (табл. 9).

Колымские криопэги характеризовались высоким содержанием сульфатов (до 3.82 г/л) и численностью СВБ была значительной (до 2×10^6 кл/мл). Тем не менее, все попытки выделить чистые культуры сульфатредукторов не увенчались успехом. Возможно, это было связано с их облигатной зависимостью от некоторых компонентов среды обитания. Из распресненных криопэгов полуострова Варандей нам удалось получить чистую культуру штамм В15^Т, восстанавливающую сульфат при росте на лактате, формиате, водороде, пирувате и этаноле.

5.1.3 Полуостров Ямал

Количественную оценку общей численности бактерий в образцах воды из трех криопэгов, вскрытых на полуострове, различающихся соленостью, осуществляли как методом прямого счета (МПС), так и методом ПЦР “в реальном времени” (qPCR) с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f/1492r на ген 16S рРНК. В

результате общая численность бактерий, полученная с помощью qPCR, составила 5.2×10^8 и 1.2×10^7 копий гена 16S рНК/мл в криопэгах 1Y и 3Y, соответственно. Численность бактерий, полученная методом прямого счета, составила 8.2×10^8 , 4.2×10^7 и 3.2×10^6 кл/мл в криопэгах 1Y, 2Y и 3Y, соответственно (табл. 9 и 11). Для определения общего количества СВБ использовали метод предельных разведений (МПР) и qPCR с применением стандартной пары праймеров DSR1F/DSR4R (Wagner et al., 1998) на функциональный ген бисульфитредуктазы *dsrAB*.

Таблица 11. Общая численность бактерий и сульфатредукторов в криопэгах п-ва Ямал.

Криопэг	Минерализация, г/л	Общая численность бактерий		Общая численность СВБ	
		МПС*, кл/мл	qPCR**, копий гена/мл	МПР***, кл/мл	ПЦР-РВ, копий гена <i>dsrAB</i> /мл
1Y	14.6	8.2×10^8	5.2×10^8	2×10^3	6.9×10^3
2Y	56.23	4.2×10^7	н.о.	0	0
3Y	77.16	3.2×10^6	1.2×10^7	2×10^2	2.7×10^2

*МПС - метод прямого счета; ** qPCR - ПЦР “в реальном времени”; ***МПР - метод предельных разведений; н.о. - не определяли.

СВБ были обнаружены в криопэгах 1Y и 3Y в количестве 6.9×10^3 и 2.7×10^2 копий гена *dsrAB*/мл, соответственно. Порядок численности СВБ соответствует данным, полученным МПР: 2×10^3 и 2×10^2 кл/мл в криопэгах 1Y и 3Y, соответственно. В криопэге 2Y сульфатредукторы не были обнаружены. Следует отметить, что с увеличением солёности воды в криопэгах уменьшалась как общая численность бактерий, так и численность СВБ.

Для оценки эффективности подбора селективных условий для роста сульфатредукторов при разных температурах культивирования в накопительных культурах ямальских криопэгов K1S, K2S и K3S был также применен метод qPCR. Накопительные культуры выращивали при 6 и 15°C в течение 60 дней. Тотальную ДНК, выделенную из накопительных культур, использовали в qPCR с праймерами DSR1F/DSR4R на ген *dsrAB*. Анализ полученных данных показал, что численность СВБ в накопительной культуре K1S увеличилась с 10^3 до 10^4 , а в накопительной культуре K3S от 10^2 до 10^5 копий гена *dsrAB*/мл.

Отсутствие СВБ в образце воды криопэга 2Y и накопительной культуре K2S можно объяснить несколькими причинами: 1) низкой численностью СВБ, не превышающей пороговый уровень чувствительности пары праймеров DSR1F/DSR4R (100 кл/мл) и метода МПР; 2) наличием представителей новых родов СВБ, не амплифицирующихся с

данной парой праймеров; 3) созданием неоптимальных селективных условий для присутствующих в образце СВБ. Тем не менее, нельзя исключить и полное отсутствие СВБ в образце криопэга 2У.

Микробиологический анализ высокоминерализованных криопэгов Колымской низменности, распресненных криопэгов Варандейского и, находящихся на промежуточной позиции по минерализации криопэгов полуострова Ямал, показал, что обитателями этих экосистем являются психрофильные галотолерантные сообщества, в которых численность анаэробных бактерий и архей составила от 0.2 до 25% от общей популяции. Сравнение первых двух экосистем показало, полная изолированность Колымских криопэгов от влияния внешних факторов в течение геологического времени, привела к значительной численности анаэробных микроорганизмов, в то время как в молодые Варандейские криопэги с пресными поверхностными водами периодически поступает кислород, и мы обнаружили аэробов на несколько порядков больше, чем анаэробов. В целом, по данным общего счета, менее соленые и более теплые криопэги населяли более многочисленными микробными популяциями.

5.2 Разнообразие архей в вечной мерзлоте Арктики

На данный момент результаты исследований архейного разнообразия в многолетнемерзлых породах, полученные культурально-независимыми методами, продемонстрировали отсутствие или небольшое разнообразие метаногенов (Høj *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2009; Blake *et al.*, 2015). Однако, эти работы проводились с образцами активного слоя мерзлоты, в основном не содержащими метан, вероятно, ввиду его быстрого окисления метанотрофами. В то же время, метагеномный анализ двух образцов многолетнемерзлых пород различного происхождения показал значительные различия в составе архейных микробных сообществ в зависимости от содержания метана (Krivushin *et al.*, 2015; Rivkina *et al.*, 2016). Для того, чтобы оценить разнообразие некультивируемых архей, в том числе метаногенов, для исследования были взяты образцы ММО Арктики, содержащие биогенный метан.

Нами были отобраны пять образцов, полученных из скважины, пробуренной на Колымской низменности в ходе экспедиции в район озера Якутское в 2007 году. Образцы представляли собой различные горизонты ММО: активный KL50 (верхняя часть мерзлоты, замерзающая зимой и оттаивающая летом); KL400 и KL1450 (слой с годовыми колебаниями отрицательных температур); KL1750 и KL2200 (слой с постоянными отрицательными температурами) (табл. 12).

Таблица 12. Характеристика исследованных образцов многолетнемерзлых отложений Колымской низменности

Образец	Глубина, м	Возраст, лет*	Содержание общего C _{орг} , %	CH ₄ , мм кг ⁻¹	δ ¹³ CH ₄ , ‰*
Активный слой					
KL50	0.50-0.55	н.о.	4.1	0.035	н.о.
Слой с годовыми температурными колебаниями					
KL400	4.0-4.1	н.о.	1.5	0.648	-72
KL1450	14.5-14.6	н.о.	0.8	0.313	-88
Слой с постоянными отрицательными температурами					
KL1750	17.5-17.6	23800±170	0.27	0.104	-85
KL2200	22.2-22.3	30700±390	0.34	0.503	-95

н.о. - не определено; * - данные Краев *et al.*, 2013

В результате амплификации общей ДНК, выделенной из каждого образца, с универсальными архейными праймерами и последующим клонированием, были созданы пять клоновых библиотек, объем выборки которых составил от 81 до 88 клонов с покрытием от 70 до 93% (табл. 13). Выборка библиотеки клонов гена *mcrA* включала от 43 до 59 клонов, а общее количество флотипов составило 37 (табл.13). В каждом образце ММО были обнаружены от 3 до 23 таксономических групп архей. Покрытие составило 59-95%, что выше средних значений, необходимых для достоверной характеристики разнообразия в библиотеках.

Таблица 13. Характеристика библиотек клонов генов 16S рРНК и *mcrA* из исследованных образцов

Библиотека клонов	Образцы									
	KL50		KL400		KL1450		KL1750		KL2200	
Гены	16S рРНК	<i>mcrA</i>								
Размер библиотеки (количество клонов)	83	43	88	57	80	59	88	55	81	58
Покрытие, %	71.1	86.0	78.4	59.6	92.5	94.9	90.9	92.7	70.3	82.8
Индекс доминирования Симпсона (D)	0.26	0.96	0.37	0.20	0.72	1.04	0.30	0.93	0.38	0.78
Индекс видового разнообразия Шеннона (H)	3.55	1.52	3.05	3.80	1.39	1.15	2.76	1.44	3.42	2.07

В полученных библиотеках доминантным (57-93% архейных клонов) оказался филум *Euryarchaeota*. Кроме того, во всех исследованных образцах были обнаружены представители филума *Bathyarchaeota*. Остальные последовательности 16S рРНК гена были отнесены к филумам *Thaumarchaeota* и *Woesearchaeota*.

Четыре ветви филума *Euryarchaeota* включали известные метанобразующие группы: ацетокластические метаногены, относящиеся к родам *Methanosarcina* и *Methanosaeta* порядка *Methanosarcinales*; и водородиспользующие метаногены родов *Methanoregula* и *Methanocella* порядков *Methanomicrobiales* и *Methanocellales*. Филотип *Candidatus* 'Methanoperedenaceae' (Haroon *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015) порядка *Methanosarcinales* был обнаружен в четырех из пяти образцов и имел сходство по 16S рРНК с семью филотипами, три из которых относились к родственной филогенетической группе *Methanoregulaceae* порядка *Methanomicrobiales*. (рис. 9).

Таблица 14. Филотипы архей в исследованных образцах мерзлых грунтов по распределению клонов 16S рРНК и *mcrA* генов.

Таксономическая принадлежность	Распределение ОТЕ по образцам									
	16S рРНК ген					<i>mcrA</i> ген				
	1*	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>Euryarchaeota</i>	1	2			1					
<i>Methanobacteria</i>										
<i>Methanobacterium</i>						2		1		2
<i>Methanomicrobia</i>										
<i>Methanocella</i>			1				2			1
<i>Methanomicrobiales</i>	5	2		1						
<i>Methanoregula</i>	3	3		2	4	1	13	1		4
<i>Methanosarcinales</i>	2				3					
<i>Ca.</i>	3	4		1	1		2		4	1
' <i>Methanoperedenaceae</i> '										
<i>Methanosarcina</i>	6	2	1	1		3	3	1		1
<i>Methanosaeta</i>	1	2			1					1
<i>Woesearchaeota</i>			2	1	8					
<i>Thaumarchaeota</i>		2		1	3					
<i>Bathyarchaeota</i>	3	2	2	1	3					

*1-5 соответствуют образцам KL50 –KL2200 в табл.1

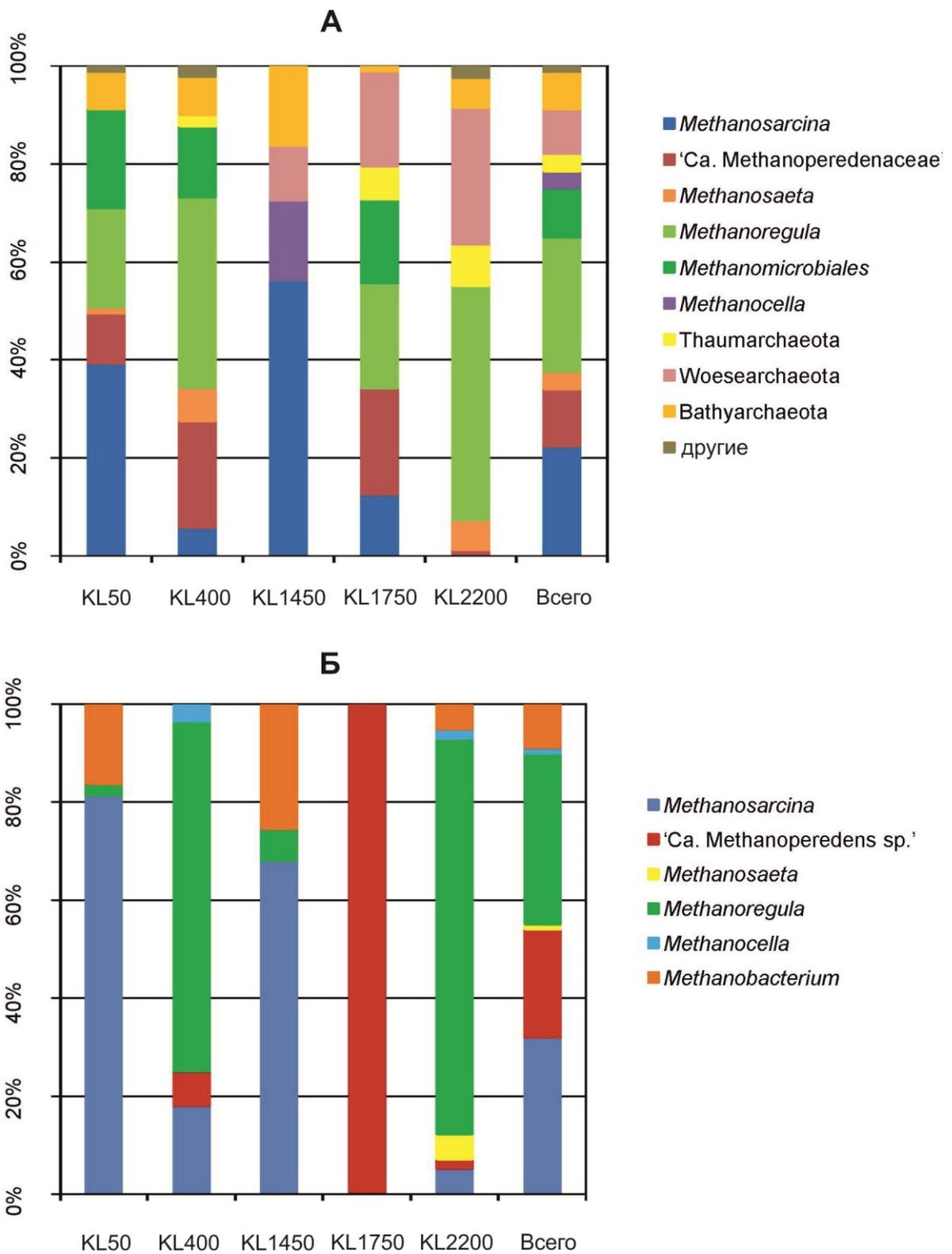


Рис. 9. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов 16S рРНК (А) и *mcrA* (Б) архей из исследованных образцов многолетнемерзлых пород.

В дополнение к метаногенной составляющей, в образцах KL50, KL400, KL2200 присутствовал минорный филотип (1.2-2.5% клонов), относящийся к порядку *Thermoplasmata*, который включал группу MBG-D (KL-16S-OTU35 и KL-16S-OTU26). На основании молекулярного и филогенетического анализа, проведенного Пауль с соавторами (Paul *et al.*, 2012), микроорганизмы данной группы содержат *mcrA* ген и, вероятнее всего, могут осуществлять метаногенез.

Две ветви *Thaumarchaeota* включали три филотипа относящихся к C3 и SCG группам архей близкородственным роду *Nitrososphaera* (Steiglmeier *et al.*, 2014). Филогенетическая группа *Woesearchaeota*, главным образом группа DHVEG-6, включала 11 филотипов, большинство из которых были обнаружены в образце KL2200 (рис. 9А и Приложение 2, табл. 1).

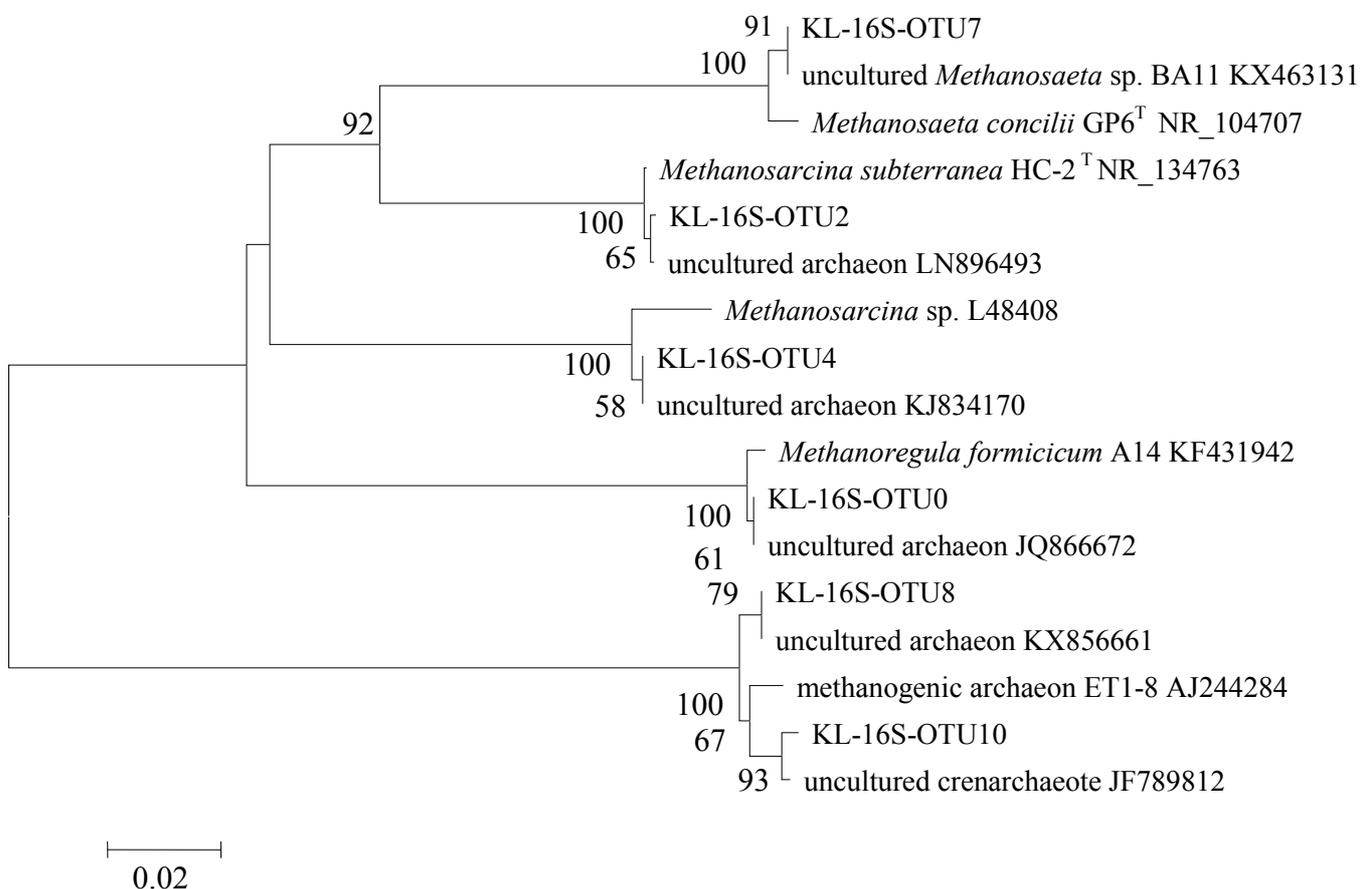


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рНК (~505 п.о) филотипов, обнаруженных более, чем в трёх образцах многолетнемёрзлых отложений. Степень ветвления определена методом “*neighbor-joining*”. Данные “bootstrap”- анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Анализ последовательностей гена 16S рРНК показал, что шесть филоотипов встречались более чем в трех образцах ММО (рис. 10). Семь таксономических групп имеют нуклеотидные последовательности, на 100% идентичные ранее секвенированным последовательностям, полученным из природных образцов холодных мест обитания, таких как, вода, отложения пресноводных озер, болот и многолетней мерзлоты (Приложение 2, табл. 1). Так, филоотип KL-16S-OTU0 (22.1% общего числа клонов), чьим близким родственником оказался вид *Methanoregula formicica* (97% сходства), был идентичен с филоотипом, полученным из образцов устья Жемчужной реки в Китае на глубине 1.5 м (Chen *et al.*, 2014).

Вторая большая группа клонов (8.8%), относящаяся к филоотипу KL-16S-OTU4, представляет новое семейство порядка *Methanomicrobiales* (рис. 9А) и включает последовательности, полностью совпадающие с последовательностями, обнаруженными в образцах мерзлых отложений Цинхай-Тибетского нагорья, Китай (Приложение 2, табл. 1).

32% общего количества последовательностей *mcrA* гена были отнесены к роду *Methanosarcina*, 35% - *Methanoregula*, 9% - *Methanobacterium*. К филоотипу *Ca.* 'Methanoperedenaseae' относилось 22% последовательностей, обнаруженных только в образцах трех самых нижних из исследованных горизонтов (рис. 9 Б).

Сравнение последовательностей *mcrA* гена, полученных в результате наших исследований, с последовательностями, помещенными в GenBank, показало, что представители родов *Methanoregula* (KL-*mcrA*-OTU9) и *Methanocella* (KL-*mcrA*-OTU36) полностью идентичны таксономическим группам, полученным ранее из образцов горных областей Швейцарии и Китая, а последовательность *mcrA* гена филоотипа *Ca.* 'Methanoperedens sp.' (KL-*mcrA*-OTU11) полностью совпала с последовательностью, полученной из образца анаэробного биореактора (Приложение 2, табл. 2).

Полученные последовательности гена *mcrA* были отнесены к классам *Methanobacteria* и *Methanomicrobia*. Доминирующим оказался класс *Methanomicrobia*, который, в свою очередь, включал филоотипы, относящиеся к порядкам *Methanocellales* (3 ОТЕ), *Methanomicrobiales* (9 ОТЕ) и *Methanosarcinales* (16 ОТЕ) (Приложение 2, табл. 2).

Значительные отличия между метаногенными археями по последовательностям *mcrA* гена были обнаружены в образцах KL1450 и KL2220. Более 60% всех исследованных клонов представляли метаногенные филоотипы, использующие для роста и получения энергии CO₂ и H₂.

Помимо метаногенных филоотипов, обнаруженных в библиотеке клонов гена 16S рРНК, в трех образцах (KL50, KL1450 и KL2200) были также найдены филоотипы рода *Methanobacterium*. Два из них могут представлять новые таксоны, в то же время две

другие последовательности были идентичны последовательностям гена *mcrA* водородпотребляющего *Methanobacterium* sp. штамм SMA-27, выделенного из многолетнемерзлого образца острова Самойловский (Россия).

Результаты исследования образцов вечной мерзлоты молекулярно-генетическими методами показали, что во всех образцах присутствовали археи. Представители неметаногенных архей филума *Bathyarchaeota* были также обнаружены во всех исследуемых образцах. Этот филум в настоящее время состоит из шести семейств без культивируемых представителей. Геномные данные позволили обнаружить, что археи *Bathyarchaeota* в качестве источников углерода и энергии способны использовать пептиды, углеводы, жирные кислоты или ароматические соединения (Lloyd *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016). Кроме того некоторые представители филума обладают генами, отвечающими за образование ацетата из CO₂ и H₂ (He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016), и предполагается их участие в метановом цикле (Evans *et al.*, 2015). Такая метаболическая гибкость и способность к росту на широком спектре субстратов дает экологическое преимущество для представителей филума *Bathyarchaeota* и объясняет их значительное представительство.

Представители филума *Woesearchaeota* были обнаружены в трех самых глубоких образцах (KL1450, KL1750, KL2250) и значительная часть последовательностей гена 16S рРНК осталась не идентифицированной. Как показали данные полногеномного секвенирования некультивируемых представителей *Woesearchaeota*, археи этой группы обладают небольшими геномами (Castelle *et al.*, 2015), а их метаболические пути указывают на то, что их главная роль в биогеохимическом цикле углерода заключается в симбиогенезе.

Проведенные исследования показали, что в отбираемых образцах по мере увеличения глубины увеличивалось метаногенное биоразнообразие, что, вероятно, является результатом преобладания анаэробных условий. Но также нами было обнаружено снижение разнообразия метаногенных архей в образцах KL1450 и KL1750, не смотря на то, что в образце KL1750 методом qPCR была обнаружена самая высокая численность метаногенов (табл. 15), в то время как во всех образцах она была менее 100 кл/г. Следует отметить, что сульфатредукторы в этих образцах обнаружены не были.

В образце KL2200, взятом из самого глубокого горизонта, количество метаногенных фило типов неожиданно возросло. Количество общего органического углерода в исследуемых образцах понижалось в зависимости от глубины и достигло минимального значения (0.27-0.37%) на глубине 17-17.5 м (KL1750) и 22-22.5 м (KL2200). Возможно, в более глубоких горизонтах ММО содержались органические соединения,

более доступные для метаногенов, такие, как метиламины или ацетат, а также водород, который используют гидрогенотрофные метаногены. Однако, это предположение требует

Таблица 15. Общая численность прокариот, метаногенных архей и СВБ в исследованных образцах.

Образец	Глубина, м	Общее количество прокариот, копий генов 16S рРНК/г	Количество метаногенов, копий генов <i>mcrA</i> /г	Количество СВБ, копий гена <i>dsrAB</i> /г
KL50	0.50-0.55	5.0×10^6	< 100	0
KL400	4.0-4.1	8.3×10^6	<100	0
KL1450	14.5-14.6	2.4×10^7	<100	0
KL1750	17.5-17.6	4.1×10^7	1.3×10^5	0
KL2200	22.2-22.3	3.9×10^6	<100	0

более тщательных исследований. Кроме того, есть основание полагать, что процесс смещения метана во время промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться отжатием (миграцией) микробных клеток, что объясняет их разнообразие.

В четырех из пяти исследуемых образцов были обнаружены филоциты, относящиеся к роду *Methanoregula*. На данный момент этот род включает два вида – *Methanoregula formicica* и *M. boonei*, относящихся к облигатным мезофильным водородиспользующим метаногенам, выделенным из кислых болот и анаэробного биореактора (Brauer *et al.*, 2006; Yashiro *et al.*, 2011). Таким образом, соотношение водород- и ацетатиспользующих филоцитов в исследуемых образцах подтверждает ранее выдвинутое предположение о преобладании водородпотребляющих метаногенов в многолетнемерзлых отложениях (Rivkina *et al.*, 2007).

Метаногенные археи, обнаруженные в данном исследовании, относились к культивируемым и некультивируемым порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanobacteriales*. Семь филоцитов порядка *Methanosarcinales* были идентифицированы как представители ранее предложенного семейства *Ca. 'Methanoperedenaceae'* (Naroon *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015). В настоящее время данное семейство не имеет культивируемых представителей. Основываясь на данных геномов, авторы описания предполагают, что *Ca. 'Methanoperedenaceae sp.'* может получать

энергию в процессе анаэробного окисления метана (АОМ) с использованием нитрата как конечного акцептора электронов.

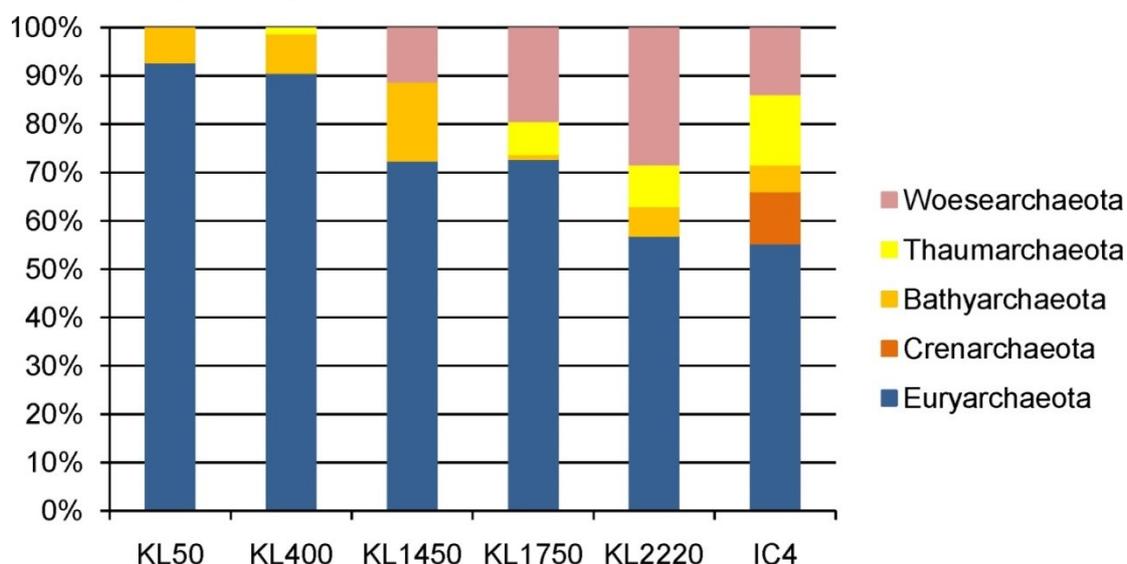


Рисунок 11. Распределение архейных таксонов на уровне филума, основанное на последовательностях генов 16S рРНК в образцах исследованных многолетнемерзлых отложений. Данные для образца IC4 получены из MG-RST (4606864.3). Образец IC4 отобран с того же горизонта, что и образец KL2200.

Таким образом, в результате наших исследований впервые удалось идентифицировать представителей архейного микробного сообщества пяти арктических метаносодержащих образцов вечной мерзлоты различного возраста и представляющих горизонты различных температурных режимов. Сравнение данных, полученных нами, и данных метагеномного анализа (Rivkina et al, 2016) в одном и том же образце (KL2200) были сходными, что делает их более достоверными. Мы обнаружили значительное разнообразие метаногенных архей, хотя численность метаногенов в этих образцах не превышала 1.3×10^5 клеток в г породы (табл. 15). Проведенные исследования показали, что в изучаемых образцах по мере увеличения глубины наблюдалось увеличение архейного разнообразия, что, вероятно, связано с преобладанием анаэробных условий в нижних горизонтах. Еще одно объяснение более разнообразного представительства метаногенов и архей заключается в том, что процесс промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться миграцией микробных клеток за фронтом промерзания.

ГЛАВА 6. АНАЭРОБНЫЕ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ ПРОКАРИОТЫ ИЗ МЕРЗЛЫХ ГРУНТОВ И КРИОПЭГОВ

6.1 Сахаролитические анаэробные бактерии

Исследование многолетнемерзлых образцов высокоширотной канадской Арктики позволило нам выделить первую бактерию из самой глубокой скважины в мерзлоте, пробуренной на поле Taglu, в дельте реки Маккензи. Накопительная культура облигатных анаэробных бактерий была получена из метаногенной накопительной культуры, полученной путем помещения образца вечной мерзлоты с глубины 12.5 м на минеральную среду, содержащую ацетат и H_2+CO_2 в качестве субстратов, и инкубации при 4°C в течение 2-х лет. В результате пересева накопительной культуры на среду, содержащую глюкозу и пептон, была выделена чистая культура анаэробного микроорганизма, который был назван штамм A121^T. Накопительные культуры облигатно психрофильных анаэробных бактерий из криопэга Колымской низменности получали путем посева проб на минеральную среду различной солености с глюкозой и пептоном в качестве субстрата. Посевы инкубировали в течение трех месяцев при 5°C. В результате последовательных пересевов единичных колоний с твердой на жидкую среду были выделены две чистые культуры бактерий с бродильным типом метаболизма, штаммы 14D1^T и 14F^T.

Морфология клеток. Клетки штамма A121^T, 14D1^T и 14F^T имели типичную структуру для видов рода *Clostridium* (рис.12). По Граму все клетки окрашивались положительно. Клетки штамма A121^T были подвижными прямыми палочками шириной 1.0-1.2 мкм и длиной 3-10 мкм, с закругленными концами (рис. 12, а), часто встречающимися в парах или в виде коротких цепей. Как показал анализ ультратонких срезов клеток в электронном микроскопе (Рис. 12 б, в), клеточная стенка изолята не содержала наружную липопротеиновую мембрану. Сферические или эллипсоидальные эндоспоры (Рис. 12, в) образовывались субтерминально с выпячиванием клеточной стенки. Клетки штамма 14D1^T представляли собой подвижные прямые палочки с закругленными концами размером 1.2-1.5×3-7 мкм, часто находящиеся в парах (рис. 12, г). Палочки подвижны за счет перитрихально расположенных жгутиков (рис. 32, д). Анализ ультратонких срезов клеток штамма в электронном микроскопе показал, что клеточная стенка изолята не содержит наружную мембрану. Сферические эндоспоры (рис. 12, г, е, ж) образовывались обычно в центре клетки или субтерминально, не раздувая клеточную стенку. Ультратонкие срезы и криосколы спорулирующих клеток (рис. 12, в, г) показали, что споры штамма 14D1^T имели строение, типичное для *Firmicutes*. Зрелая спора содержала кортекс и характерные споровые покровы (рис. 12, е, ж).

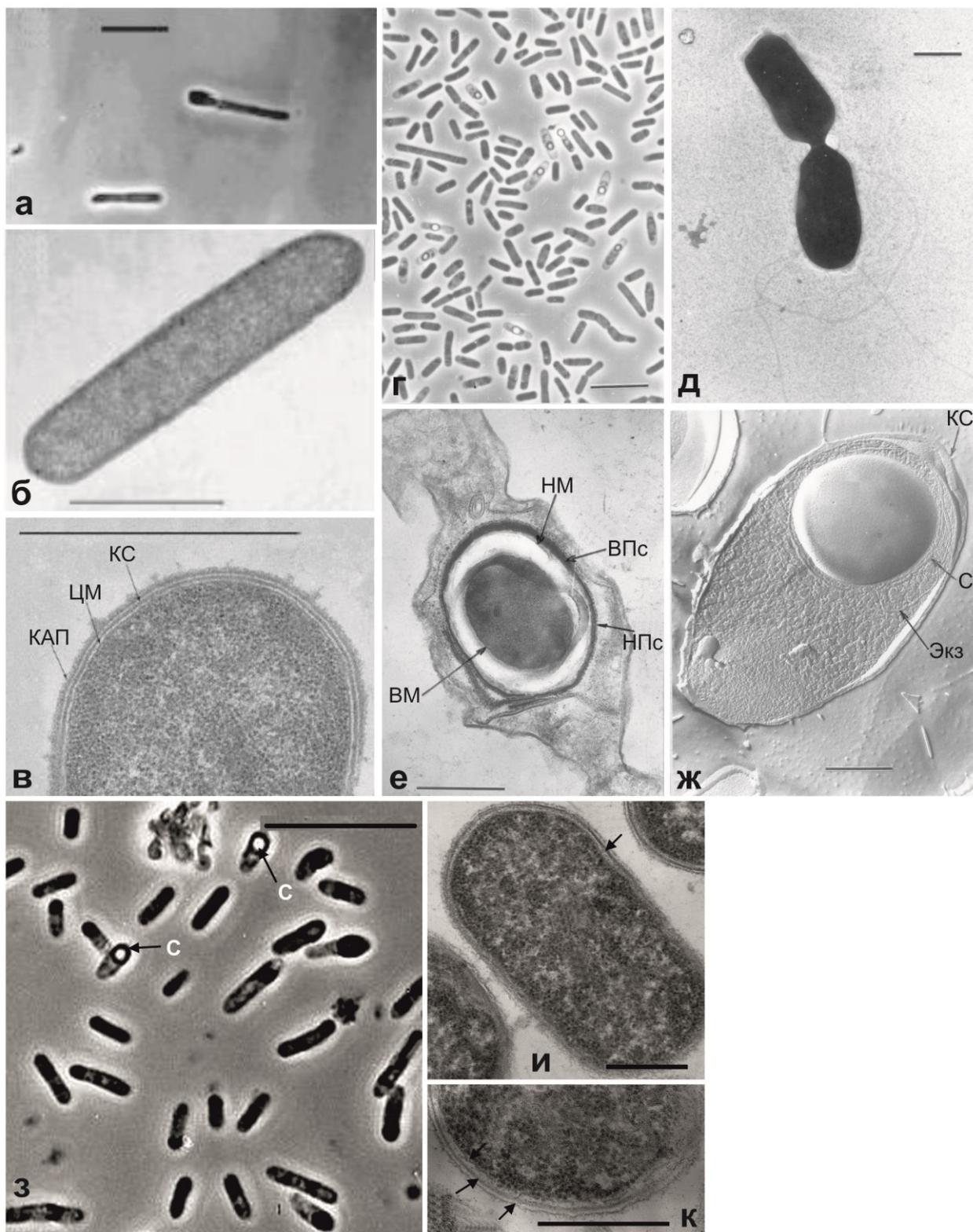


Рисунок 12. Микрофотографии клеток выделенных клостридий: (а), фазовый контраст, штамм A121^T; (б), (в) ультратонкие срезы активно растущих культур, штамм A121^T; (г) фазовый контраст, штамм 14D1^T; (д) негативно окрашенные клетки штамма 14D1^T; (е) ультратонкий срез зрелой споры, штамм 14D1^T; (ж) криоскол спорующей клетки, штамм 14D1^T; (з) фазовый контраст, штамм 14F^T; (и), (к) ультратонкие срезы, штамм 14F^T. Длина масштабной метки: (а), (г), (з) - 10 мкм; (б), (в), (д), (е), (ж) - 1 мкм; (и), (к) - 0.5 мкм. Условные обозначения: КС-клеточная стенка; ВМ – внутренняя мембрана споры, НМ – наружная мембрана споры. К-кортекс, ВПс – внутренние покровы споры, НПс – внешние покровы споры; С – спора; Экз-экзоспориум; Кр-кор.; КАП –

капсула. С-спора, МК-микрокапсула, ЦМ-цитоплазматическая мембрана, Н-нуклеоид, Ц-цитоплазма.

Клетки штамма 14F^T представляли собой неподвижные прямые с закругленными концами палочки размером 1-1.2×2-4 мкм, одиночные или в парах (рис. 12, з). Исследования ультратонких срезов показали наличие клеточной стенки грамположительного типа, но снаружи помимо муреинового находился еще один электронплотный слой, по-видимому, микрокапсула (Рис. 12, и, к). Жгутики отсутствовали. Эндоспоры сферические (Рис. 12, з), образовывались обычно субтерминально и терминально, раздувая клеточную стенку.

Влияние температуры, pH и концентрации NaCl на рост. Штамм A121^T рос при температуре от 4 до 28°C, с максимальной скоростью роста при 15 °С. Очень медленный рост наблюдался при -2°C, ниже этой температуры бактериальный рост не тестировали. Время удвоения в оптимальных условиях составляло 12.7 часа. Рост наблюдался в диапазоне значений pH от 6.0 до 8.0 при оптимальном pH 6.8-7.2. Влияние NaCl на рост штамма A121^T проверяли при оптимальной температуре роста (15°C). Штамм оптимально рос при концентрациях 0-2.0 % NaCl. Рост ингибировался при 14% NaCl в среде.

Штаммы 14D1^T и 14F^T росли в диапазоне температур от -5 до 18°C, оптимальной для роста обоих штаммов была температура 5°C. Рост обоих штаммов отмечен в интервале солености от 0 до 2.0 % NaCl с оптимумом при 0.5 % для штамма 14D1^T и 0.1-0.5 % для штамма 14F^T. При 3.0 % рост не наблюдался. Штамм 14D1^T рос в диапазоне pH от 4.5 до 8.5. Оптимальное значение pH для роста штамма составляло 6.5-7.2. Штамм 14F имел более узкий диапазон (5.5-8.0) и оптимум (6.8-7.0) pH для роста.

Использование источников углерода и акцепторов электронов. Использование источников углерода и энергии. Изоляты были способны использовать в качестве источников углерода и энергии широкий спектр углеводов, а также некоторые спирты, органические кислоты и сложные органические субстраты, такие как пептон, триптиказа, дрожжевой экстракт и казаминовые кислоты. Спектры использованных субстратов представлены в описаниях видов.

Продукты метаболизма. Рост штамма 14D1^T на глюкозе при оптимальной температуре роста (5°C) приводил к образованию в жидкой фазе бутирата и лактата приблизительно в соотношении 1:1. Кроме того, образовывались небольшие количества ацетата, изобутирата, формиата и этанола. Среди негазообразных продуктов метаболизма глюкозы штамма 14F^T основным был бутират, минорным – лактат. Среди негазообразных продуктов брожения штамма A121^T преобладали ацетат, бутират и валерат и небольшое количество формиата и этанола. После брожения на глюкозе в газовой фазе у всех

штаммов накапливались H_2 (10-12%) и CO_2 . Штаммы не восстанавливали нитрат и серосодержащие соединения.

Состав клеточной стенки. Пептидогликан клеточной стенки всех новых штаммов содержал *meso*-диаминопимелиновую кислоту. Такое строение муреина характерно для кластридиального кластера I. Полный состав жирных кислот клеток штаммов A121^T, 14D1^T и 14F^T приведен в табл. 2, Приложения 3. В жирнокислотном профиле штамма A121^T доминировали мононенасыщенные $C_{16:1}$ гексадекановая кислота (18.8%) и гексадеценальдегид (22%) с двойной связью при C_7 , как и пальмитиновая кислота $C_{16:0}$ (15%) и миристиновая кислота $C_{14:0}$ (10.4%). Доминирование форм $C_{16:1\omega 7}$ в профиле жирных кислот штамма A121^T, очевидно, отличает изолят от антарктических видов *Clostridium*. В липидном комплексе штамма 14D1^T преобладали мононенасыщенная гексадеценная кислота $C_{16:1}$ с положением двойной связи у 9-го атома углерода (37 %) и миристамовая кислота $C_{14:0}$ (32.6 %). Как видно из табл. 2 (Приложения 3), первая кислота является также преобладающей в жирнокислотном профиле антарктических кластридий (25.4 – 30.7 %), а вторая – у *C. estertheticum* (28.4 %). Жирнокислотный профиль штамма 14F^T, в основном, содержал миристамовую кислоту $C_{14:0}$ (37.9 %) и гексадеценальдегид (20.3%) $C_{16:1}$ с двойной связью при C_7 .

Условия спорообразования. В клетках штамма A121^T формирование споры не наблюдалось в период экспоненциального роста. Образование одиночных спор наблюдалось в старых культурах, после инкубации при 28°C и после замораживания-оттаивания. Нагревание при 50, 60, 70 или 80°C не способствовало образованию спор. В период экспоненциальной фазы роста образование спор у штаммов 14D1^T и 14F^T также не наблюдалось, но старые культуры содержали единичные споры. Подкисление среды до pH 3.5 – 4.0, замораживание – оттаивание или прогревание до 50, 60, 70 или 80°C не приводило к образованию спор. Наблюдалось частичное образование спор на бедной среде. Помещение вегетативных клеток изолятов в воду криопэга без добавления питательных веществ стимулировало образование спор как штаммом 14D1^T, так и штаммом 14F^T. Споры обоих штаммов не обладали терморезистентностью: пастеризация культур, содержащих споры, в течение 10 минут приводила к полной потере жизнеспособности.

Нуклеотидный состав ДНК. Содержание Г+Ц пар в ДНК составило для штаммов A121^T, 14D1^T и 14F^T составило 31.5, 31.4 и 32.0 и мол.%, соответственно, что находится в пределах, определенных для штаммов психрофильных кластридий (табл. 16).

Филогенетический анализ. Были получены большие фрагменты последовательностей генов 16S рРНК штаммов A121^T (1454 п.о.), 14D1^T (1481 п.о.) и 14F^T

(1388 п.о.). Поиск в GenBank и филогенетический анализ показал, что новые бактерии попадают в кластер антарктических изолятов (рис. 13) и двух подвидов *C. estertheticum* (Spring et al., 2003). Ближайшими соседями штамма являются *C. bowmanii* DSM 14206^T, *C. psychrophilum* DSM 14207^T, *C. frigoris* DSM 14204^T, *C. lacusfryxellense* DSM 14205^T и выделенная из вакуумированной упаковки замороженного мяса *C. estertheticum* DSM 8809^T с сходством 97-98% (рис. 13). Напротив, значение сходства антарктического психрофильного изолята *C. vincentii*, не относящегося к «полярному субкластеру», было не более 89%.

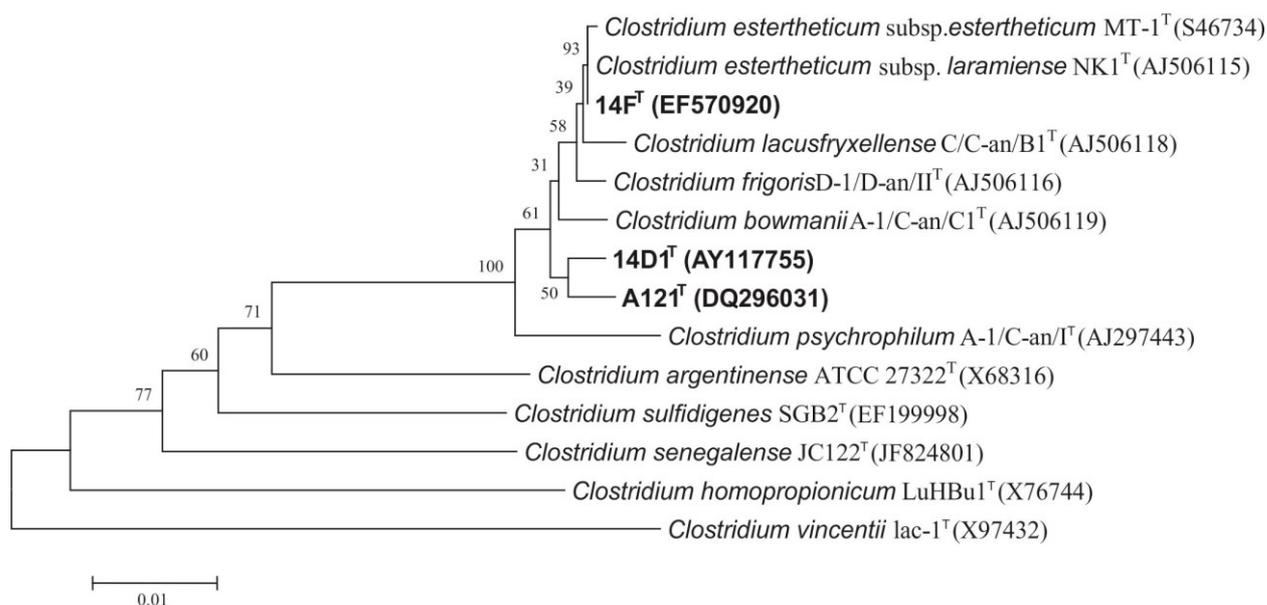


Рис. 13. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, показывающая положение новых психрофильных клостридий, выделенных в работе. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “*neighbour-joining*”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Таблица 16 Сравнительные характеристики штаммов, выделенных в работе, и филогенетически близких видов рода *Clostridium*. Штаммы: 1. A121^T; 2. 14D1^T; 3. 14F^T; 4. *C. bowmanii* DSM 14206^T; 5. *C. frigoris* DSM 14204^T; 6. *C. lacusfraxellense* DSM 14205^T; 7. *C. psychrophilum* DSM 14207^T; 8. *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* DSM 8809^T.

Потребление субстратов определяли по увеличению OD₆₀₀: + большое количество образованных кислот и газа, w – слабая продукция, - нет образования продуктов, ND – нет данных. Список образующихся продуктов отражает: заглавные буквы – концентрации выше 10 мМ. Продукты, образующиеся в незначительных количествах (<1мМ) не показаны. Условные обозначения: а – уксусная кислота, b – масляная кислота, f – муравьиная кислота, v – валериановая кислота, l – молочная кислота, 2 – этанол, 4 – бутанол. Все штаммы утилизировали D-глюкозу и фруктозу. Данные получены в этом исследовании и взяты из работ Spring et al. 2003 и Collins et al. 1992.

† Эллипсоидальная, E; сферическая, S; ‡ центральное, C; субтерминальное, ST; терминальное, T

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8
Форма споры †	S	S	S	S	S	S	S	E
Расположение споры ‡	ST	C	T	T-ST	T	T-ST	T-ST	ST-C
T оптимум, °C	15	5-6	5-6	12-16	5-7	8-12	4	6-8
Утилизация:								
арабиноза	-	+	+	-	+	-	+	+
целлобиоза	-	+	+	-	+	+	+	w (+)
галактоза	-	+	+	+	+	+	-	+
лактоза	-	+	+	-	+	+	-	-
мальтоза	+	+	+	+	+	-	+	+
манноза	-	+	+	+	+	-	+	+
мелицитоза	-	+	-	-	+	+	-	-
мелибиоза	-	+	-	-	+	+	-	+
раффиноза	-	+	+	-	+	+	-	+
рамноза	-	-	+	-	+	-	-	+
сахароза	-	+	+	+	+	+	+	+
ксилоза	-	+	+	+	+	+	+	+
рибоза	-	+	+	+	w	+	-	-
крахмал	+	-	+	-	+	+	-	w (+)
трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	-
ксилан	-	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
Гидролиз желатина	+	-		-	-	-	-	-
Продукты брожения*	A, B, v, f, 2	B, L, a, f, 2	A, L, f	B, A, f, 2, l, 4	B, f, l, a, 2	B, F, a, l, 2	L, 2, 4, b	B, A, f, l, 4, 2
G+Ц, мол. %	31.5	31.4	32.0	32.0	31.9	32.1	31.8	33.9
Источник выделения	Арктика Канады	Криопэги, Арктика России	Криопэги, Арктика России	Озерные осадки, Антарктида	Озерные осадки, Антарктида	Озерные осадки, Антарктида	Озерные осадки, Антарктида	Замороженное мясо в вакуумной упаковке

Предложение новых видов рода *Clostridium*. Род *Clostridium* объединяет грамположительные спорообразующие строго анаэробные бактерии, не способные к сульфатредукции и представляет собой один из крупнейших родов прокариотов, охватывающий более 220 видов бактерий с широким спектром метаболических свойств и содержания Г+Ц пар в ДНК от 22 до 55 мол.% (Collins et al., 1994; Garrity et al., 2004). Выделенные из вечной мерзлоты и криопэггов Колымской низменности штаммы A121^T, 14D1^T и 14F^T обладают характерными признаками рода *Clostridium*. Штаммы являются психрофилами, так как способны расти при отрицательной температуре, что хорошо согласуется с природными условиями источников выделения.

Согласно данным филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК, штаммы наиболее близки к кластеру психрофильных клостридий, и имеют 97-99.6% сходства с *C. frigoris* DSM 14204^T, *C. bowmanii* DSM 14206^T, *C. estertheticum* DSM 8809^T и *C. lacusfryxellense* DSM 14205^T (табл. 17). Также на их близость указывает сходное содержание ГЦ-пар в ДНК. Данные ДНК-ДНК гибридизации штаммов между собой и с близкородственными клостридиями показали достаточно низкий процент сходства - от 27 до 52% (табл. 17).

Штамм 14D1^T имеет центральное расположение спор, что отличает его как от антарктических клостридий, так и от штамма 14F^T, имеющих терминальное и субтерминальное расположение спор. Оптимум рН для роста новых штаммов лежал в узком диапазоне нейтральных значений рН (6.8-7.2), что является общим почти для всех сравниваемых видов. Оптимальный рост при температуре 5-6°С кроме выделенных нами штаммов отмечался у *C. frigoris* и *C. estertheticum*. Штаммы ферментировали широкий спектр сахаров, по которому они отличались как друг от друга, так и от близкородственных клостридий (табл. 16). Отличия касались также продуктов метаболизма, обнаруживаемых в культуральной жидкости. Так, для штамма 14D1^T было характерно образование лактата как мажорного продукта, что не было показано ни для одного из близкородственных видов. Среди продуктов брожения штамма 14F^T не обнаруживалось ацетата, что было характерно также для *C. psychrophilum*. Штамм A121^T особенно схож с *C. bowmanii* DSM 14206^T по оптимальной температуре (15 °С) роста и является единственным из арктических и антарктических клостридий, характеризующийся способностью гидролизовать желатину.

Таким образом, несмотря на высокое сходство по последовательностям гена 16S рРНК, новые изоляты четко дифференцировались друг от друга и от близкородственных видов по данным ДНК-ДНК гибридизации, морфологии клеток, физиолого-биохимическим свойствам. На основании этих отличий, а также учитывая уникальность

источника выделения, мы считаем правомочным отнесение штаммов A121^T, 14D1^T и 14F^T к новым самостоятельным видам рода *Clostridium*: *Clostridium tagluense* sp. nov., *Clostridium algoriphilum* sp. nov. и *Clostridium frigoriphilum* sp. nov. (Suetin *et al.*, 2009; Shcherbakova *et al.*, 2005)

Таблица 17. Степень ДНК-ДНК гибридизации (левая нижняя часть таблицы) и сходство по последовательностям 16S рРНК (правая верхняя) между новыми изолятами и психрофильными видами рода *Clostridium*, % сходства.

		1.	2	3.	4.	5	6.	7
1	A121 ^T	-	98.2	98.4	98.2	98.1	98.5	94.4
2	14D1 ^T	48	-	98.2	97.8	97.9	98.0	97.1
3	14F ^T	н.о.	51	-	99.6	98.7	98.4	97.8
4	<i>C. frigoris</i> DSM 14204 ^T	33	38	50	-	99.1	98.4	97.8
5	<i>C.lacusfryxellense</i> DSM 14205 ^T	35	27	45	16	-	98.5	97.5
6	<i>C.bowmanii</i> DSM 14206 ^T	35	42	44	33	47	-	97.0
7	<i>C.psychrophilum</i> DSM 14207 ^T	52	39	48	49	40	36	-

Краткое описание новых видов клостридий

Clostridium tagluense (tag.lu.en'sis. N.L. neut. adj. *tagluense* по названию газогидратного поля Таглу на Северо-западных территориях Канады, откуда штамм был выделен.).

Клетки штамма A121^T представляют собой грамположительные подвижные палочки с закругленными концами (ширина 1.0 - 1.2 мкм и длина 3 - 10 мкм), встречающиеся в виде одиночных клеток или в парах. Эндоспоры сферические - слегка эллипсоидные и расположены в субтерминально с выпячиванием клеточной стенки. На агаре РУ образует круглые, выпуклые, кремовые колонии, 1-2 мм в диаметре. Бактерия является облигатно анаэробной. Штамм способен медленно расти при отрицательных температурах. Температурный оптимум для роста составляет 15°C, верхний предел роста - 28°C, при 37°C рост не наблюдался. Диапазон изменения рН составляет 6.0-8.0 с оптимальным рН 6.8-7.2. В оптимальных условиях время удвоения составляет 12.7 часа. Помимо пептона и дрожжевого экстракта, штамм использует фумарат, малат, триптиказу, бетаин, холин, глюкозу, мальтозу, фруктозу, трегалозу. Рост не наблюдали на ксилане, арабинозе, целлобиозе, лактозе, маннозе, сахарозе, рибозе, раффинозе, рамнозе,

мелибиозе, мелизитозе, инозитоле, маннитоле, салицине. Сбраживание пептона и дрожжевого экстракта приводит к образованию бутирата, ацетата, валерата, этанола, H_2 и CO_2 . Штамм гидролизует желатину и не гидролизует крахмал. В пептидогликане клеточной стенки содержится мезо-диаминопимелиновая кислота. Основными жирными кислотами клеточной стенки являются $C_{16:1\omega 7}$, $C_{16:0}$ и $C_{14:0}$. Содержание Г+Ц пар в ДНК составляет 31.5 мол. %.

Типовой штамм A121^T (=VKM B-2271^T = DSM 17763^T) был выделен из образцов вечной мерзлоты газогидратного поля Taglu в высокоширотной Арктике Канады. Последовательность гена 16S рРНК депонирована в GenBank под номером DQ296031.

Clostridium algoriphilum sp.nov. (al.go.ri'phi.lum. L. masc. n. algor -oris, холод; N.L. neut. adj. Phylum-любящий; N.L. neut. adj. algoriphilum, холодолюбивый).

Клетки – палочки с закругленными концами (1.2-1.5×3-7 мкм) одиночные или в парах. Подвижные с перитрихально расположенными жгутиками. Эндоспоры сферические, центральные. По Граму окрашиваются положительно. Колонии достигают 1-2 мм в диаметре, круглые выпуклые кремового цвета. Температурный оптимум роста 5-6°С, верхний предел роста 20°С. рН диапазон роста 4.5-8.0 с оптимумом 6.8-7.2. Оптимум солености 5 г/л, диапазон для роста 0-20 г/л. Строгий анаэроб. Утилизирует следующие субстраты: ксилозу, инозит, сорбит, галактозу, мальтозу, глюкозу, арабинозу, маннозу, сахарозу, рибозу, манит, фруктозу, рафиннозу, мелобиозу, целлобиозу, пептон, дрожжевой экстракт, фумарат, малат, лактозу, триптиказу, трегалозу, ксилан, бетаин, холин. Желатин и крахмал не гидролизует. При сбраживании сахаров образует бутират, формиат, лактат, ацетат, этанол, H_2 и CO_2 . Пептидогликан содержит мезо-диаминопимелиновую кислоту. Доминирующие жирные кислоты клеточной стенки $C_{14:0}$ и $C_{16:1\omega 9}$.

Типовой штамм 14D1^T (=VKM B-2271^T = DSMZ 16153^T) выделен из криопэга в вечной мерзлоте, Колымская низменность, Северо-Восточная Арктика, Россия. Содержание ГЦ пар в ДНК типового штамма составляет 31.4 мол. %. Последовательность гена 16S рРНК помещена в GenBank под номером AY117755.

Clostridium frigoriphilum sp.nov. (fri.go.ri.phi'lum. L. n. frigus -oris, холод; Gr. adj. philos, любящий; N.L. neut. adj. frigoriphilum, холодолюбивый)

Клетки – палочки с закругленными концами 1-1.2 × 2-4 мкм, одиночные или в парах, неподвижные, жгутики отсутствуют. По Граму окрашиваются положительно. Эндоспоры сферические, терминальные. Имеется микрокапсула. Колонии достигают 1-2 мм в диаметре, круглые выпуклые кремового цвета. Температурный оптимум роста 5-6°С, верхний предел роста 20°С. рН диапазон роста 5.5-8.0 с оптимумом 6.7-7.0. Оптимум

солености 1-5 г/л, диапазон 0-20 г/л. Строгий анаэроб. Утилизирует глюкозу, ксилозу, инозит, сорбит, галактозу, мальтозу, арабинозу, маннозу, сахарозу, рибозу, маннит, фруктозу, рафиннозу, мелобиозу, трегалозу, крахмал, ксилан, целлобиозу, пептон, дрожжевой экстракт, fumarat, малат, лактозу, триптиказу, бетаин, холин. При сбраживании сахаров образует ацетат, лактат, пропионат, H_2 и CO_2 . Основными жирными кислотами клеточной стенки являются диметилацетальдегид $C_{16:1}$ и $C_{14:0}$.

Типовой штамм 14F^T (=VKM B-2368^T = DSM 17811^T) выделен из криопэга в вечной мерзлоте, Колымская низменность, Северо-Восточная Арктика, Россия. Содержание ГЦ пар в ДНК типового штамма составляет 32.0 мол.%. Последовательность гена 16S рРНК помещена в GenBank под номером EF570920.

6.2 Сульфатредуцирующие бактерии из арктических криопэгов

Диссимиляционное восстановление сульфата является главным анаэробным путем минерализации органического вещества в холодных морских средах обитания (Jørgensen, 1982; Knoblauch et al., 1999a). В последнее время, психофильные и психроактивные сульфатредуцирующие бактерии были выделены из постоянно холодных мест обитания как представители новых таксонов (Knoblauch et al., 1999b; Vandieken et al., 2006a, b; Vatsurina et al., 2008). Арктические криопэги Колымской низменности характеризовались содержанием сульфатов до 3.84 г/л (табл. 6), и высокой численностью СВБ. Однако наши попытки выделить бактерии, восстанавливающие сульфат, из этих криопэгов были unsuccessful. Криопэги Варандея и Ямала были менее холодными (-2;-4°C) и в меньшей степени минерализованными, возможно, поэтому нам удалось подобрать условия для выделения и охарактеризовать первых сульфатредукторов из экосистем Арктики, способных расти при отрицательной температуре.

6.2.1 Сульфатвосстанавливающая бактерия из криопэга на полуострове Варандей

Накопительная культура штамма В15 была получена путем инокуляции 20 мл среды 10 мл пробы криопэга, вскрытого скважиной 21 на Варандейском полуострове, и инкубации при температуре 15°C. Накопительные культуры, в которых наблюдалось образование сероводорода, использовали как посевной материал для последующих пересевов и десятикратных разведений. Чистая культура штамма В15^T была получена методом посева в тонкий слой пристенного агара с последующим пересевом образующихся колоний в жидкую среду.

Морфология. Штамм В15^T в тонком слое агара в роллингах после 2-3 недель инкубации образовывал темно-коричневые колонии 2-3 мм в диаметре. Клетки штамма

представляли собой одиночные или в коротких цепочках грамотрицательные вибрионы (рис. 14, а) размером 3-4 мкм×0.4-0.5 мкм, подвижные за счет одного полярно расположенного жгутика (рис. 14, б)

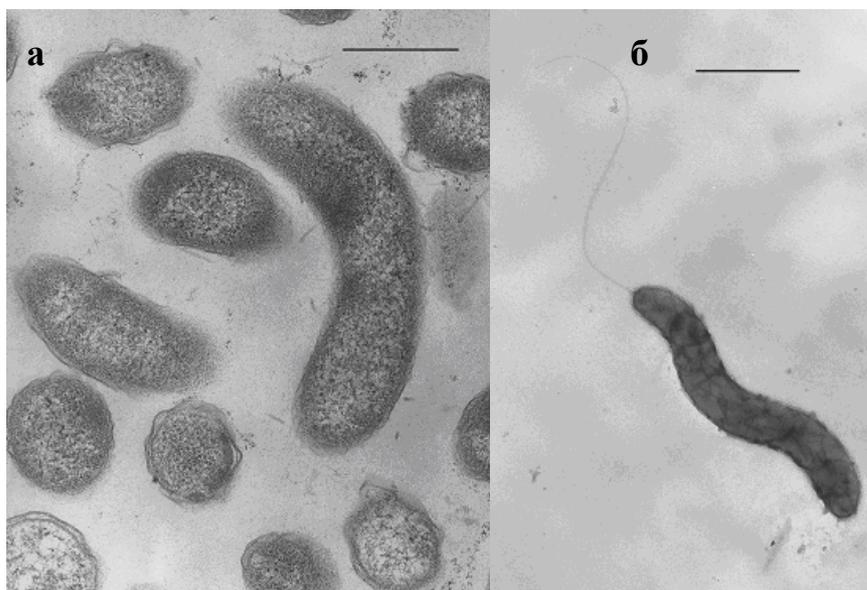


Рис. 14. Клетки штамма B15^T а) ультратонкие срезы, длина масштабной метки 0.5 мкм; б) негативное окрашивание, длина масштабной метки 1 мкм.

Параметры роста. Штамм рос в диапазоне температур от 5 до 28°C. Оптимальной для роста была температура 24°C. При 37°C рост не наблюдался, то есть данный микроорганизм являлся психротолерантным мезофилом. Рост отмечен в интервале солености от 0 до 10 г/л NaCl с оптимумом при 2 г/л. Оптимум pH-6.7-7.0.

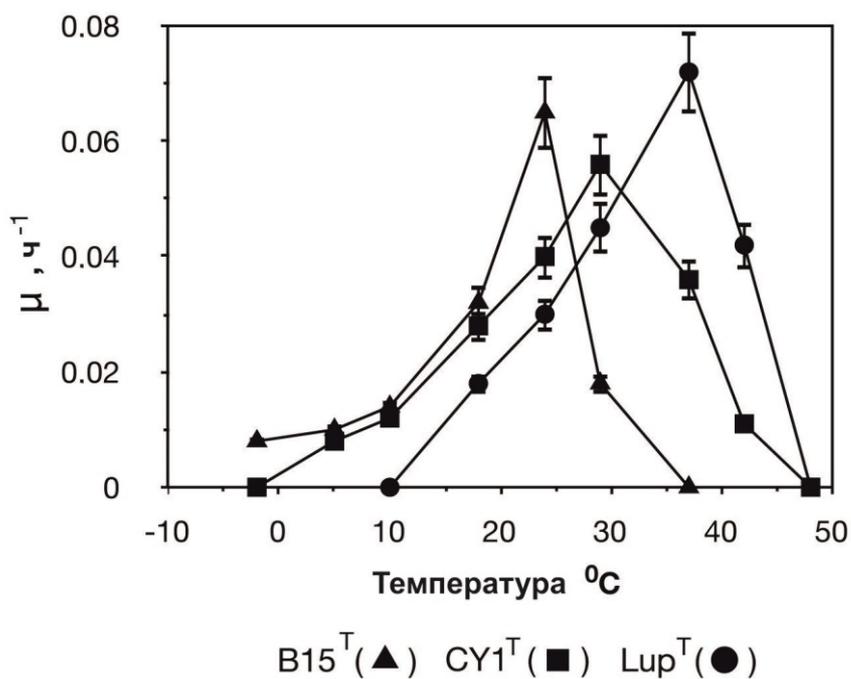


Рис. 15. Влияние температуры на скорость роста штаммов B15^T, *D.idahonensis* CY^T и *D.mexicanus* Lup^T.

Доноры и акцепторы электронов. В присутствии сульфата в качестве акцептора электронов штамм B15^T окислял водород (время удвоения 8.6 ч), формиат (20.0 ч), лактат (9.4 ч), пируват (12 ч) и этанол (17 ч). Для штамма было характерно неполное окисление лактата с образованием ацетата и CO₂. Штамм не рос на ацетате, пропионате, бутирате, валерате, малате, сукцинате, глицерине, аланине, валине, лейцине, метионине, аргинине, лизине, пролине, гистидине, серине, цистеине, бетаине, глюкозе, фруктозе, дрожжевом экстракте, казामीновых кислотах и пептоне.

В качестве **конечных акцепторов электронов** штамм использовал сульфат, сульфит, тиосульфат, элементную серу и DMSO. Штамм B15^T был способен восстанавливать трехвалентное железо, но роста при этом не наблюдалось.

При росте на лактате в присутствии сульфата в качестве конечного акцептора электронов рост штамма B15^T стимулировался добавлением дрожжевого экстракта в концентрации 0.1 и 0.5 г/л. При этом время удвоения сокращалось с 9.4 ч до 6.7 и 5.6 ч, соответственно.

В спектре поглощения были обнаружены пики при 552 и 630 нм, что указывает на присутствие цитохромоксидазы и десульфовиридина, соответственно.

Филогенетический анализ. Мы определили большой фрагмент нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма B15^T, которая составила 1425 нуклеотидов. Поиск в GenBank с помощью программы BLASTn показал близкое родство штамма с представителями рода *Desulfovibrio*. На филогенетическом древе (рис. 17.) показано положение штамма B15^T в составе рода *Desulfovibrio*. Штамм B15^T объединяется в единый кластер с типовыми штаммами видов *D. idahonensis* CY1^T и *D.mexicanus* Lup1^T с уровнем сходства нуклеотидных последовательностей 98.5 и 96.5%, соответственно.

6.2.2 Сульфатредуктор из криопэга на полуострове Ямал

Накопительные культуры K1S, K2S и K3S были получены путем стерильного переноса образцов воды криопэгов 1Y, 2Y и 3Y на минеральную среду (рН 7.0-7.2) с лактатом, с последующей их инкубацией при температуре 6 и 15°C в течение 8 месяцев. Образование сульфида наблюдалось только в накопительных культурах криопэгов 1Y и 3Y. Для получения колоний инокулят из максимального разведения переносили на агаризованную среду и инкубировали в течение 4-5 недель. Выросшие колонии были точечные, округлые, блестящие, прозрачные, коричневого цвета, гладкие, выпуклые, с ровными краями, имели однородную структуру и маслянистую консистенцию. В

результате пересева отдельных колоний с твердой среды в жидкую, из накопительной культуры криопэга 3У был выделен штамм СВБ, обозначенный нами как K3S.

Морфология клеток. Микроскопирование препаратов живых и фиксированных клеток показало, что выделенный штамм представлен подвижными одиночными вибрионами размером 0.5×2.0 мкм (рис. 16, а). Движение осуществлялось за счет двух монополярных очехленных жгутиков (рис. 16, б). По Граму клетки штамма K3S^T окрашивались отрицательно. Микроскопические исследования не обнаружили наличие спор, кроме того после пастеризации культуры при 80°C в течение 10 минут рост бактерий также не был обнаружен.

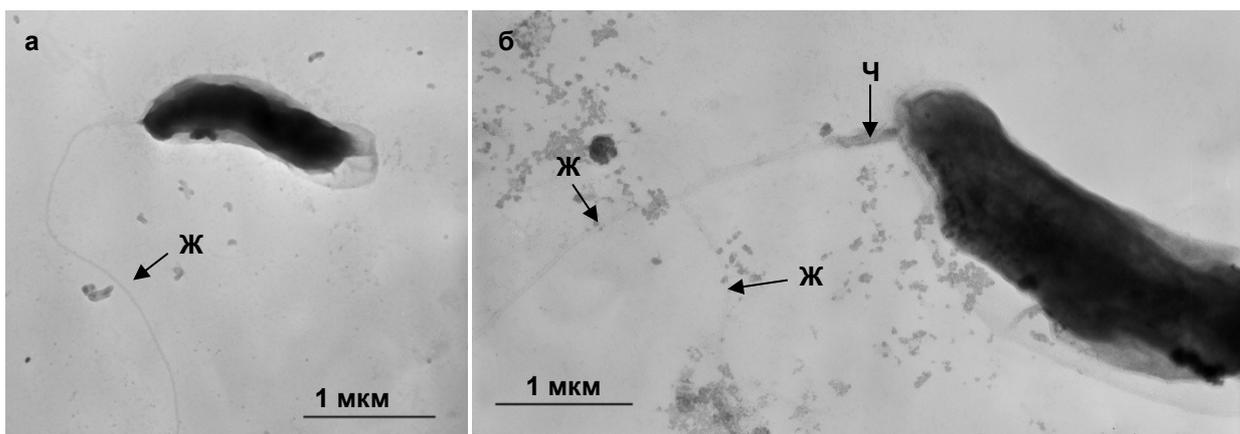


Рис. 16. Негативно окрашенные клетки штамма K3S^T. Условные обозначения: Ж- жгутик, Ч- чехол жгутика.

Влияние температуры, рН и солености. Выделенный штамм был способен расти в диапазоне температур от -2 до 36°C с оптимумом при 26°C. Штамм K3S^T рос в узком диапазоне рН от 6.8 до 7.4, максимальная скорость роста наблюдалась при рН 7.0-7.2. Рост наблюдался в диапазоне NaCl от 5 до 80 г/л. Оптимальным содержанием NaCl для роста было 20 г/л.

Использование источников углерода и энергии. Штамм K3S^T использовал лактат, формиат, пируват, фумарат, аланин, этанол и молекулярный водород в качестве доноров электронов в присутствии сульфата, причем наибольшее образование сульфида наблюдалось при росте на аланине (7.9 мМ). Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм K3S^T использовал сульфит, тиосульфат и элементарную серу с образованием сульфида 13.3, 28.7 и 14.9 мМ, соответственно. Штамм K3S^T способен также восстанавливать Fe(III) цитрат и Fe(III) ЭДТА без видимого роста. Такие акцепторы электронов как ДМСО, аморфная гидроокись Fe(III) и NaNO₃ не поддерживали рост штамма K3S^T.

Генетический и филогенетический анализ. Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма К3S составило 42.3 мол. %.

Нами была определена почти полная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма К3S^T (1402 н.о.).

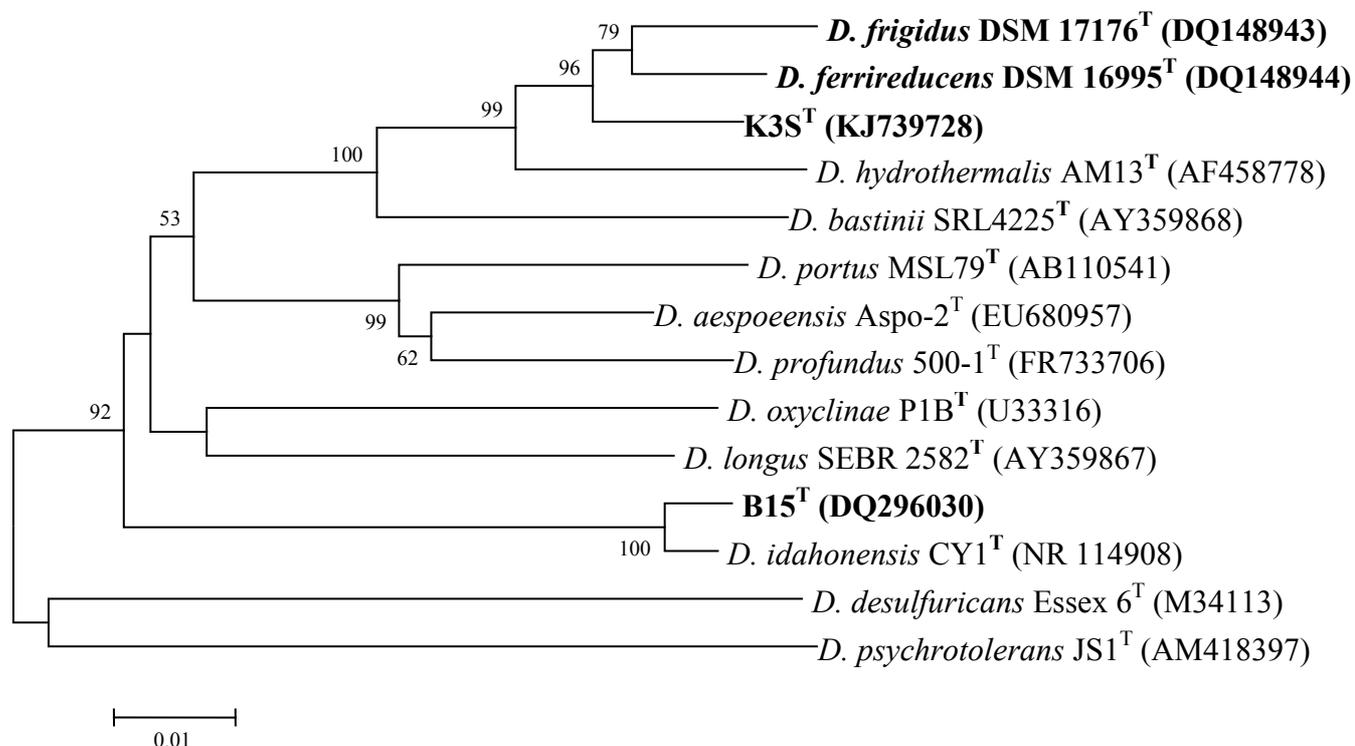


Рис. 17. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, показывающее положение штаммов B15^T и К3S^T среди представителей рода *Desulfovibrio*. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “*neighbour-joining*”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Филогенетический анализ полученной последовательности показал, что новый штамм кластеризуется с бактериями рода *Desulfovibrio*. На филогенетическом дереве (рис. 17) его ближайшим соседом с 97.4% сходства является *D. ferrireducens* - бактерия, выделенная из донных отложений Арктического шельфа в районе о. Шпицберген (Vandieken et al., 2006).

6.2.3 Предложение новых видов холодоустойчивых сульфатредукторов

Род *Desulfovibrio*, к представителям которого оказались близки выделенные нами штаммы B15^T и К3S^T, объединяет сульфатредуцирующих бактерий преимущественно вибриоидной морфологии, содержащих пигмент десульфовиридин и окисляющих субстраты не полностью (до ацетата и CO₂). Свойства выделенных из криопэггов бактерий удовлетворяют всем перечисленным выше признакам.

Таблица 18. Сравнительная характеристика новых изолятов СВБ, выделенных из криопэггов, и их близкородственных видов.

Признак	B15 ^T	<i>D. idahonensis</i> CY1 ^T	K3S ^T	<i>D. ferrireducens</i> DSM 16995 ^T
Жгутики	Монотрих	Монотрих	монополярное битрихальное	Монотрих
Размер, мкм	0.4-0.5×3.0-4.0	0,6×1,3-2,5	0.5×2.0	0.7×2.5-5.5
pH				
оптимум	6.7-7.0	6.5	7.0-7.2	7.1-7.5
Температура, °C				
пределы	-2-28	5-42	-2-36	-2-30
оптимум	24	28	26	23
NaCl, г/л				
пределы	0-20	0-10	5-40	7-40
оптимум	2	1	20	10-25
Доноры				
электронов/+SO₄				
Пируват	+		+	-
Фумарат	-	+	+	+
Аланин	-		+	-
Холин	+	-	-	н.о.
Этанол	+	-		
Акцепторы				
электронов:				
AQDS	-	+	-	н.о.
Сера	+	+	+	-
аморфное Fe(III)	+	+	-	+/-
Г+Ц, мол.%	55.2	63.2	42.3	42.0

Доноры электронов, используемые тремя сравниваемыми штаммами, включали H₂, формиат, лактат, этанол, пируват; доноры электронов, не используемые штаммами: ацетат, сукцинат, пропионат, бутират, валерат, глицерин, аланин, валин, лейцин, метионин, аргинин, маннитол и пептон. Акцепторы электронов, используемые тремя штаммами: сульфат, сульфит, тиосульфат и элементная сера.

+/- , восстановление субстрата без роста; н.о.- не определяли.

Однако представленные в табл. 18 сравнительные характеристики указывают на значительные отличия, как от близкородственных видов, так и штаммов между собой. Отличия затрагивают температурные границы роста, спектр доноров и акцепторов электронов, а также содержание ГЦ-пар в ДНК (границы для рода определены как 49-66 мол%) (Widdel, and Bak, 1992). Однако в последнее время были описаны несколько видов с достаточно низким содержанием ГЦ-пар в ДНК (Magout et al., 2004; Vandieken et al., 2005). Такой разброс значений ГЦ-состава говорит о большой гетерогенности рода и несовершенности его классификации. Поэтому мы считаем, что выделенная нами бактерия представляет новый вид рода *Desulfovibrio*, для которого мы предложили название *Desulfovibrio arcticus* (Pecheritsyna et al., 2012).

Сравнение штамма K3S^T и типового штамма вида *D. ferrireducens* DSM 16995^T показало, что их объединяет способность к росту на лактате, формиате, водороде, фумарате и этаноле и восстановлению сульфата, сульфита и тиосульфата в процессе роста (табл. 18). Оба штамма способны расти при отрицательных температурах, имеют схожие температурные диапазоны роста, являются нейтрофилами и оптимально растут при pH 7.0-7.2 (K3S^T) и 7.1-7.5 (*D. ferrireducens* DSM 16995^T). Штамм K3S^T, как и *D. ferrireducens*, являлся умеренным галофилом и облигатно нуждался в ионах Na⁺. Кроме того, новая бактерия, как и ее ближайшие родственники, оказалась способна восстанавливать трехвалентное железо в виде цитрата и ЭДТА Fe(III) без видимого роста. В отличие от *D. ferrireducens*, штамм K3S^T способен использовать пируват и аланин в качестве донора электронов, а также элементную серу как акцептор электронов.

Уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК штамма K3S^T и типового штамма вида *D. ferrireducens* (97.4%) свидетельствует о том, что новый психроактивный сульфатредуктор является представителем вида рода *Desulfovibrio*, для которого предложено название *Desulfovibrio gilichinskyi* sp. nov.

***Desulfovibrio arcticus* sp.nov.** (arc'ti.cus. L. masc. adj. *arcticus*, арктический).

Клетки представляют собой вибрионы размером 3-4 мкм×0.4-0.5 мкм, подвижные за счет одного полярно расположенного жгутика, одиночные или в коротких цепочках. Клеточная стенка грамотрицательного типа, содержит десульфовиридин. В качестве доноров электронов использует водород + ацетат, формиат, лактат, пируват, этанол в присутствии сульфата. Не сбразивает лактат и пируват. Сульфат, сульфит, тиосульфат, элементная сера, DMSO и Fe(III) служат в качестве конечных акцепторов электронов. Оптимум температуры 24°C, диапазон от -2 до 28°C. Оптимум солености 0.2%, растет при концентрации NaCl от 0 до 2%. Оптимум pH 6.7-7.0, диапазон pH 5.9-8.1.

Типовой штамм B15^T (=ВКМ В-2367^T = DSMZ 21064^T) выделен из криопэга в вечной мерзлоте на полуострове Варандей, побережье Баренцева моря, Россия. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 55.2 мол.%. Последовательность гена 16S рРНК помещена в GenBank под номером DQ296030.

***Desulfovibrio gilichinskyi* sp.nov.** (gi.li.chins.ky. N.L. masc. adj. *gilichinskyi* в честь Давида Гиличинского, выдающегося исследователя микробных сообществ вечной мерзлоты).

Клетки представляют собой грамотрицательные неспоровые одиночные вибрионы размером 0.5×2.0 мкм, подвижные за счет двух монополярных очехленных жгутиков. Строгий анаэроб. Каталазо-отрицательная бактерия. Использует лактат, формиат, водород, этанол, фумарат, аланин и пируват как донор электронов и источник углерода в

присутствии сульфата. Использует сульфат, сульфит, тиосульфат, элементную серу, Fe(III) цитрат и Fe(III) ЭДТА как акцептор электронов в присутствии лактата. Психротолерантная бактерия, растет в диапазоне температур от -2 до 36°C (оптимум 26°C). Нейтрофил, растет при pH 6.8-7.4 (оптимум 7.0-7.2). Умеренный галофил, растет в диапазоне NaCl от 5 до 80 г/л (оптимум 20 г/л). Облигатно зависит от ионов Na⁺.

Типовой штамм K3S^T (= VKM B-2877^T =DSM 100341^T) выделен из криопэга в многолетнемерзлых осадках полуострова Ямал, Россия. Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма 42.3 мол %. Последовательность гена 16S рРНК депонирована в GenBank под номером KJ739728.

6.3 Диязотрофная бактерия из Ямальского криопэга

Из криопэга (минерализация 77.2 г/л) в мерзлых толщах полуострова Ямал была выделена и охарактеризована диязотрофная бактерия, адаптированная к холоду. Получение накопительной и чистой культур происходило в анаэробных условиях с использованием серийных десятикратных разведений. В результате последовательных пересевов отдельных колоний была выделена чистая культура бактерий, способных расти в анаэробных и аэробных условиях, названная нами штамм C7^T. Чистую культуру выращивали и поддерживали при 18°C в среде, содержащей 80 г/л NaCl и 0.5 г/л MgSO₄·7H₂O и pH 6.0-6.2.

Морфология клеток. Клетки штамма C7^T были подвижными палочками с закругленными концами размером 0.7-0.8 × 2-4 мкм с одним полярным жгутиком (рис. 18, а), одиночными, в парах или в виде коротких цепей. Особенностью ультраструктуры жгутика было наличие, вероятно, белковой оболочки по всей длине, что было выявлено с помощью электронной микроскопии негативно окрашенных препаратов целых клеток (рис. 18, б). Окрашивание по Граму стандартными методами не давало точных результатов, но электронная микроскопия тонких срезов клеток штамма C7^T выявила структуру грамтрицательной клеточной стенки с типичной наружной мембраной (рис. 18, с). Кроме того, короткие фрагменты трубчатых структур на поверхности клеток и в межклеточном пространстве были хорошо видны на тонких срезах (рис.38, с). Кроме того, на периферии цитоплазмы секционных клеток были обнаружены электронплотные включения различных размеров (рис.18, с).

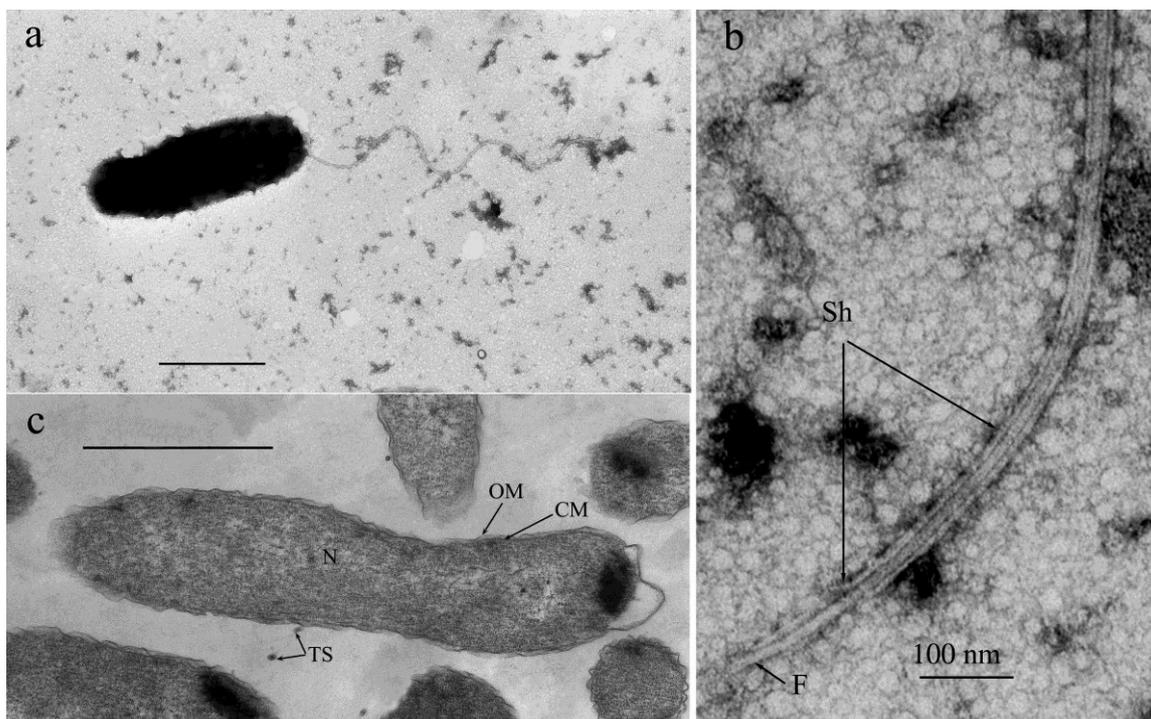


Рис. 18. Клетки анаэробной бактерии штамм $C7^T$, выделенной из ямальского криопэга: а, б– негативное окрашивание, бар 1 мкм; с – ультратонкие срезы, бар 0.5 мкм. Условные обозначения: OM- внешняя мембрана, CM – цитоплазматическая мембрана, TS – трубчатые структуры, Sh – чехол жгутика, F – жгутик.

Время инкубации культуры составляло от 1-2 недель для оптимальных условий до 2 месяцев для максимальных и минимальных значений температуры. Рост штамма $C7^T$ наблюдался при температуре от 0 до 34°C (оптимально при 18-22°C). Таким образом, он относился к факультативным психофилам в классификации Морита (Morita, 1975) или к психрофильным бактериям по классификации Кавичолли (Cavichioli, 2016).

Для штамма $C7^T$ требовалась соль в среде для роста. Рост наблюдался в диапазоне при концентраций NaCl от 20 до 120 г/л (0.34-2.1 M) с оптимальной концентрацией NaCl 40-80 г/л (0.68-1.38 M). Эти данные характеризовали выделенную бактерию как умеренно галофильную (Ogen, 2006), рост которой зависит от концентрации ионов Mg^{2+} в культуральной среде. Действительно, штамм $C7^T$ не рос без ионов магния в среде: диапазон для роста составлял 5-100 г/л $MgCl_2$ с оптимальной концентрацией 5 г/л. Штамм $C7^T$ рос в диапазоне pH от 5.5 до 7.5, тогда как оптимальный рост наблюдался при pH 6.0-6.2.

Проверка возможности использования различных источников углерода в присутствии кислорода показала, что штамм $C7^T$ рос на D-глюкозе, раффинозе, арабинозе, D-фруктозе, мальтозе, лактозе, сахарозе, целлобиозе, ксилане, дульците, сорбите, глицерине, сукцинате, фумарате, L-малате, пирувате, цитрате, D-глюконате, N-ацетилглюкозамине. Рост не наблюдался на D-галактозе, D-маннозе, меллибиозе, D-

рибозе, L-рамнозе, D-ксилозе, целлюлозе, метаноле, бутаноле, мио-инозитоле, этаноле, ацетате, формиате, бутирате, капроате, гептаноате, фумарате, малате, лактате, L-треонине, L-пролине, L-тирозине, L-глутамине, гистидине, аспарагине, DL-аргинине, L-фенилаланине, L-валине, L-цистеине, L-орнитине, L-лейцине, глицине, L-лизине, L-аланине, DL-метионине, DL-триптофане, DL-серине, хитине, глутатионе. В анаэробных условиях штамм C7^T сбраживал D-глюкозу, целлобиозу, D-глюконат и N-ацетилглюкозамин. Соединениями, испытанными, но не используемые в анаэробных условиях, были сукцинат, фумарат, L-малат, пируват и Tween 80.

Инкубация штамма C7^T с глюкозой при оптимальной температуре роста (18°C) показала, что ацетат доминирует среди негазообразных продуктов метаболизма, как в анаэробных, так и в аэробных условиях (рис. 19). Кроме того, в анаэробных условиях образовывалось около 2 мМ этанола. В газовой фазе H₂ не накапливался.

Штамм C7^T не восстанавливал нитрат, не образовывал H₂S и индол, гидролизировал желатин и Tween 80, не гидролизировал агар, крахмал и хитин. Для роста требовались дрожжевой экстракт (0.25-1.0%) или пептон (0.25-1.0%). Штамм C7^T был каталазо- и оксидазо-отрицательным. Штамм был положительным в следующих ферментативных тестах APY ZYM: щелочной и кислой фосфатазе, лейцинариламидазе, эстеразе (C₄), липазе эстеразы (C₈), нафтол-AS-VI-фосфогидролазе. Штамм был отрицательным в отношении липазы (C₁₄), валинариламидазы, цистинариламидазы, трипсина, α-химотрипсина, α-галактозидазы, β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, α-глюкозидазы, β-глюкозидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, α-маннозидазы, α-фукозидазы, аргининдезаминазы, лизинкарбоксилазы и орнитиноксилазы.

Проверка влияние антибиотиков, которые перечислены в описании вида, показала, что рост штамма подавлялся только тетрациклином.

Способность штамма фиксировать азот тестировали с использованием метода восстановления ацетилена (Stewart et al, 1968). Штамм C7^T рос в бескислородной среде и был способен к ассимиляции N₂. Активность восстановления ацетилена варьировала от 600 до 750 нмоль этилена час⁻¹/мг белка.

Жирные кислоты клеточных стенок, полярные липиды и хиноны определяли в культурах в фазе позднего экспоненциального роста при оптимальной температуре культивирования. Профиль жирных кислот штамма C7^T (Приложение 2, Таблица 2) показал преобладающее присутствие жирных кислот C_{16:0}, C_{16:1}ω7, C_{18:1}ω7 и C₁₇сус. Общее количество этих четырех соединений составило 92.9%. Анализ хинонов дыхательной цепи выявил наличие убихинонов Q-8 (98%) и Q-7 (2%).

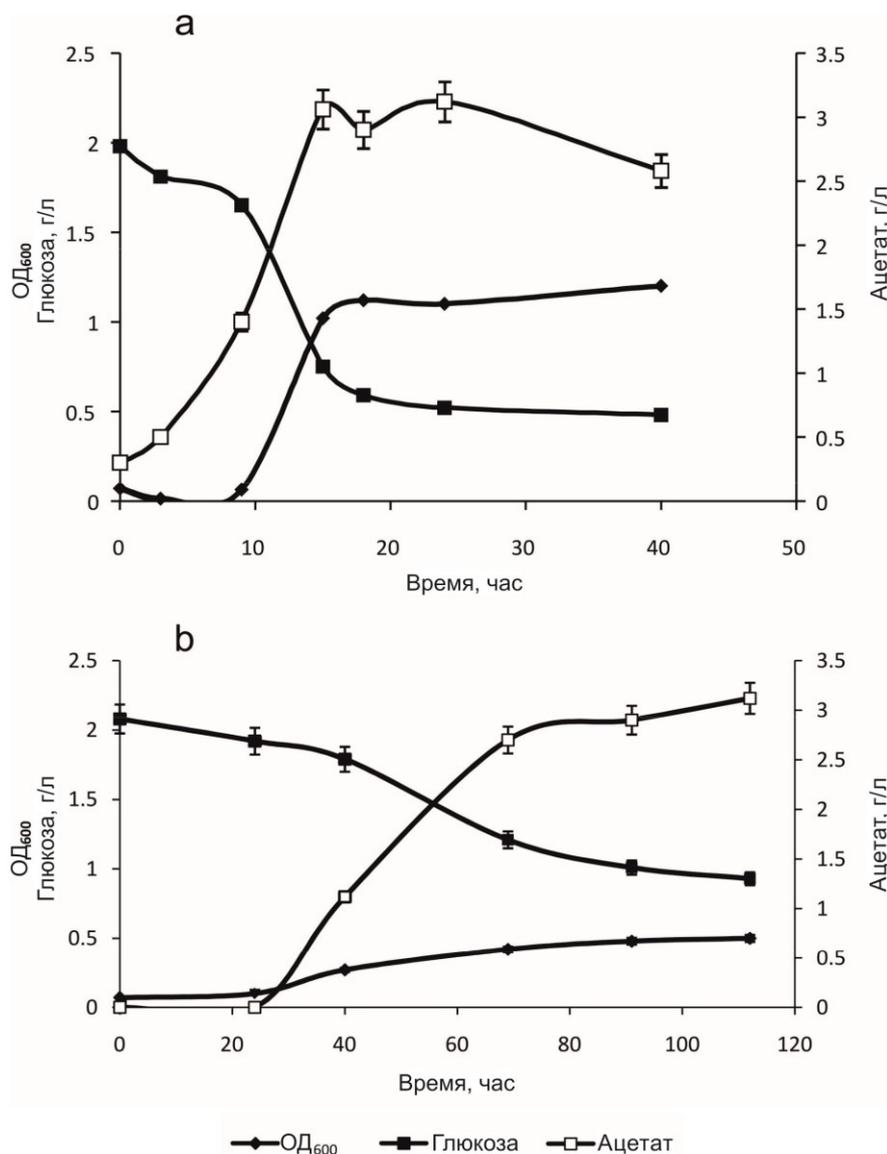


Рис. 19. Потребление глюкозы и образование ацетата штаммом $C7^T$ в аэробных (а) и анаэробных (б) условиях.

Анализ полярных липидов показал наличие фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, аминофосфолипида, а также неидентифицированных аминоклипов. Было обнаружено содержание Г+Ц пар в ДНК в штамме $C7^T$ составило 44.7 ± 0.5 мол.%.

Филогенетический анализ. Был секвенирован большой фрагмент гена 16S рРНК (1400 н.о.) из штамма $C7^T$. Сравнение близких к полноразмерным последовательностям генов 16S рРНК из штамма $C7^T$ с данными в базе данных NCBI показало, что штамм относится к классу *Gamma*proteobacteria, к семейству *Celerinatantimonadaceae* порядка *Alteromonadales*. Филогенетическое древо, полученное методом ближайших соседей (рис. 20), показало, что $C7^T$ и *C. diazotrophica* представляют собой монофилетическую линию, отличную от других членов порядка *Alteromonadales*. Деревья, построенные методами ML

и МР, показали аналогичную топологию. Наибольшее сходство последовательностей гена 16S рРНК нового штамма было с типовым штаммом валидно описанного вида *Celerinatantimonas diazotrophica* и составляло 95.5%.

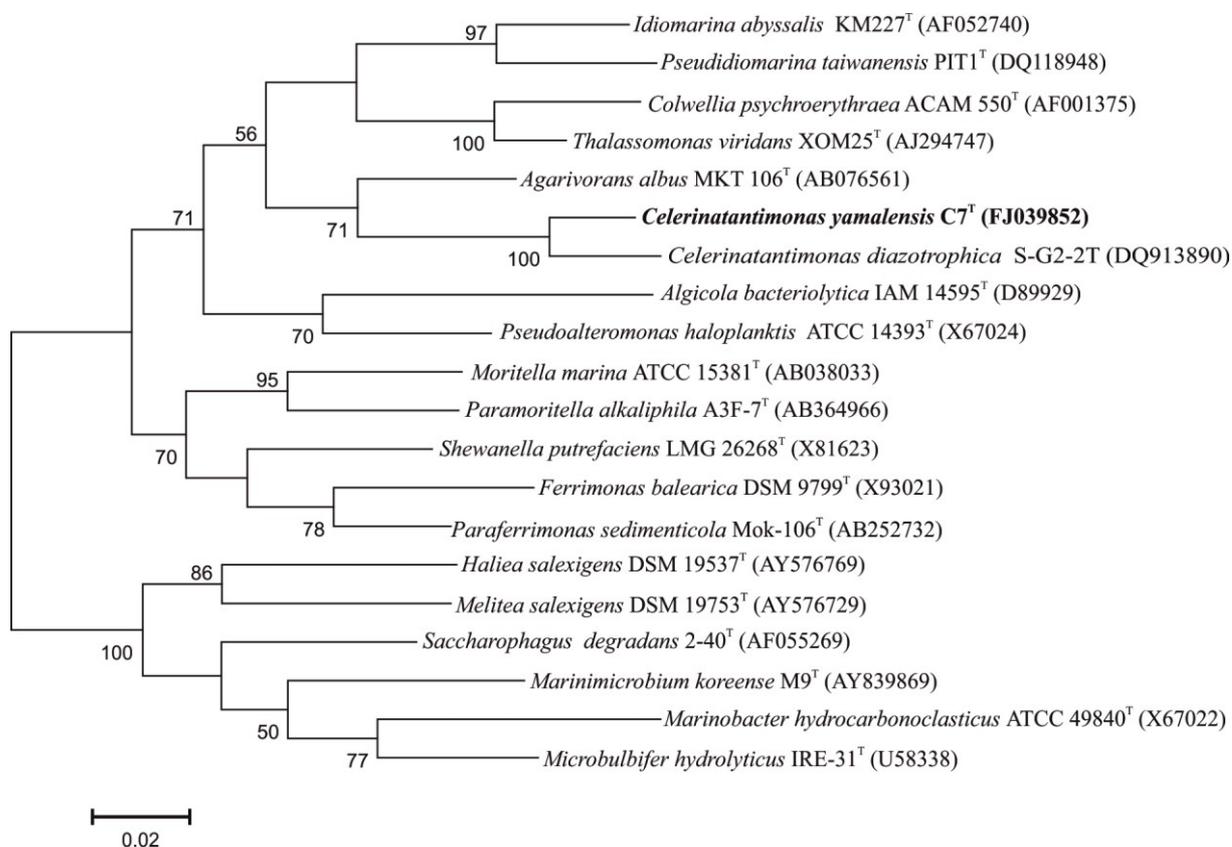


Рис. 20. Филогенетическое древо, основанное на сравнении последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение нового штамма C7^T среди представителей порядка *Altermonadales*. Для построения древа был использован метод “neighbor-joining” (Saitou & Nei, 1987) Величина вероятности ветвления менее 50% не показана. Эволюционные расстояния рассчитаны методом Jukes-Cantor method (Jukes & Cantor, 1969). Бар, 0.02 замещений на нуклеотидную позицию.

Была также определена частичная последовательность *nifH* гена для штамма C7^T и получен продукт амплификации ожидаемого размера (418 п.о.). Сравнение полученной последовательности с последовательностями *nifH* генов из базы данных GenBank для *Gamma*proteobacteria показало, что *nifH* ген штамма образовывал монофилетическую ветвь с *nifH*-генами штаммов *C. diazotrophica* (сходство 84.4%), которые хорошо выделялись из других описанных diaзотрофов этого класса (рис. 21). Последовательности *nifH*-генов штаммов *C. diazotrophica* были очень похожи друг на друга (сходство 96.7-100%) поэтому для построения филогенетического древа методом ML использовали последовательность *nifH* гена типового штамма этого вида.

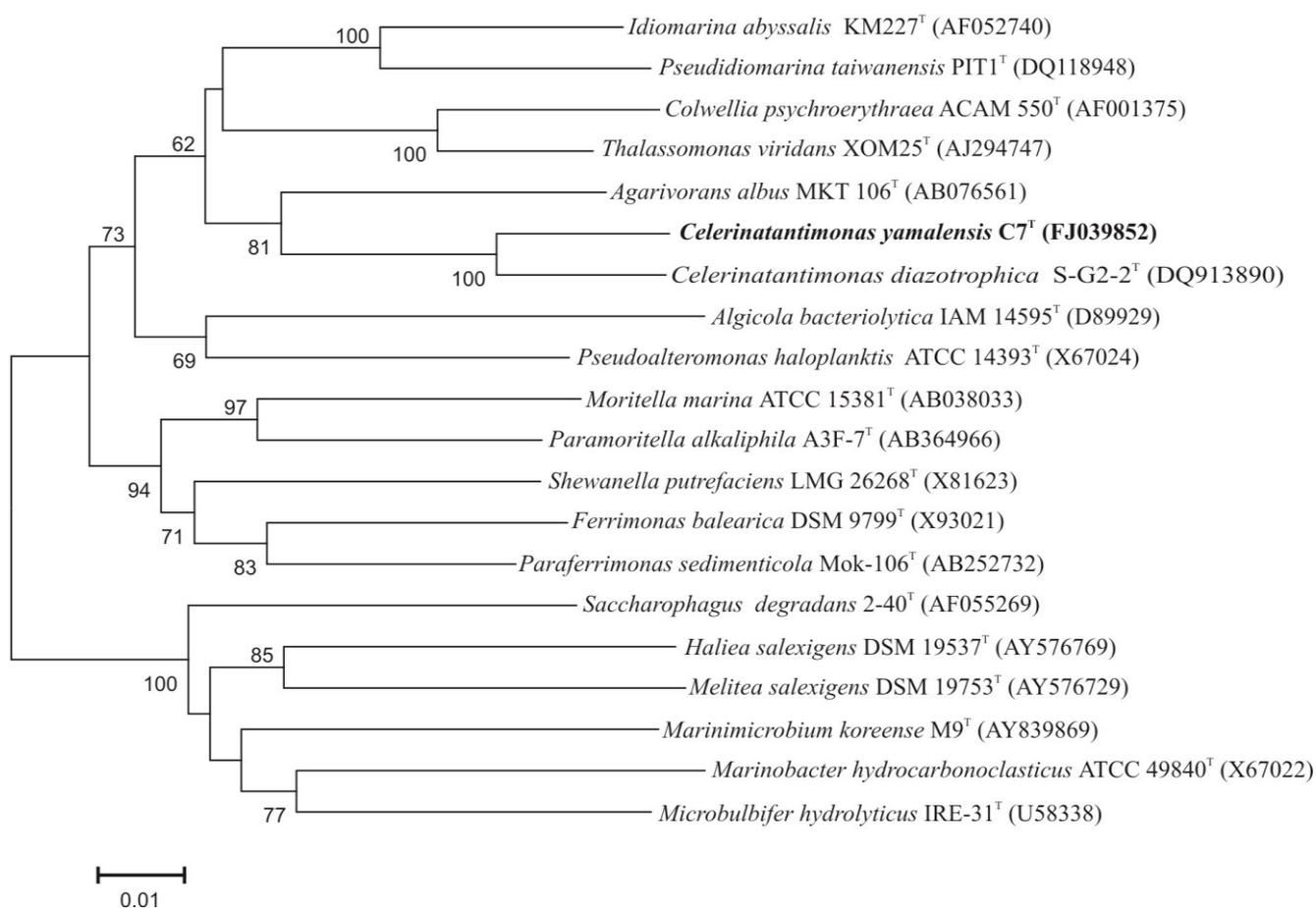


Рис. 21. Положение аминокислотной последовательности *nifH* гена штамма C7^T среди других diaзотрофных гаммапротеобактерий. Для построения древа использован метод *maximum likelihood*. Вероятность ветвления показана перед точкой ветвления, значения менее 50% не показаны. Бар, 0.01 замен на одну нуклеотидную позицию.

Alteromonadales-подобные бактерии в классе *Gammaproteobacteria* представляют собой большую группу морских, гетеротрофных, полярно-жгутиковых грам-отрицательных палочек, которые, в основном, являются аэробами, не использующими бродильный тип метаболизма. Сходство фенотипических характеристик затрудняет дифференциацию бактерий на уровне видов или даже на уровне рода. До начала наших исследований из эстуарных трав были выделены пять штаммов, представляющих новое семейство *Celerinatantimonaceae* в порядке *Alteromonadales*, (Cramer et al, 2011). Бактерии нового рода и вида *C. diazotrophica* были факультативно анаэробными, N₂-фиксирующими палочками. Невозможность штаммов *C. diazotrophica* восстанавливать нитрат и отсутствие цитохромоксидазы отличала их от большинства представителей *Alteromonadales* (Ivanova et al., 2004; Bowman and McMeekin, 2005; Brenner et al., 2005). Таким образом, штамм C7^T и *C. diazotrophica* представляют собой монофилетическую ветвь, отличную от других членов порядка *Alteromonadales*.

Биологическая фиксация азота ограничивается специализированными группами прокариотов, которые обладают ферментом азотазой. В эту группу входят как автотрофы, так и гетеротрофы. Морские гетеротрофные азотфиксирующие бактерии представляют собой таксономически разнообразную группу, которая состоит из аэробов, микроаэрофилов, факультативных и строгих анаэробов (Herbert, 1999). В условиях ограничения по азоту микробная фиксация азота представляет собой преимущество для азотфиксирующих бактерий в морской воде (Carone et al., 2008). Обнаружение адаптированной к холоду N₂-фиксирующей бактерии в арктических криопэгах очень важно для нашего понимания процессов азотного цикла в холодных экосистемах морского происхождения.

Из экосистемы в вечной мерзлоте нами выделен первый diaзотрофный бактериальный штамм C7^T, который был филогенетически близок к *C. diazotrophica*, однако значение сходства (95.5%) предполагает, что мы имеем дело с различными таксонами на уровне видов. Сравнение фенотипических характеристик показало, что штамм C7^T объединяет сходство со штаммами *C. diazotrophica* морфология клеток, способность к ферментативному метаболизму и N₂-фиксации. Однако существуют заметные различия в наличии ферментативной активности и используемом субстратном ряде (табл. 19). Основное различие, однако, заключается в значительно более низкой оптимальной температуре роста и способности штамма C7^T расти при температурах ниже 4°C.

Учитывая различия хемотаксономических, генотипических и фенотипических свойств штамма C7^T и штаммов вида *C. diazotrophica*, мы считаем новую холодоустойчивую галофильную бактерию представителем нового вида рода *Celerinatantimonas*. Для нового вида предложено название *Celerinatantimonas yamalensis* (Shcherbakova et al., 2013).

Таблица 19. Дифференцирующие характеристики штамма *C7^T* и его ближайшего филогенетического родственника типового штамма вида *C. diazotrophica*.

Характеристики	<i>C.yamalensis</i> <i>C7^T</i>	<i>C.diazotrophica</i> * <i>S-G2-2^T</i>
Размер клеток, мкм	0.7 -0.8 x 2-4	0.7x1.5
Рост с NaCl, %		
Диапазон (оптимум)	2.0-12.0 (4.0-8.0)	2.5-8.0 (7.0-7.5)
Температура, °С		
Диапазон (оптимум)	0 – 34 (18-22)	17 – 49 (31)
pH		
Диапазон (оптимум)	4.0-8.5 (6.0)	3.5-8.0 (6.0)
Каталаза	-	+
Гидролиз желатины	+	-
Утилизация источников углерода:		
Раффиноза, пируват, малат, ксилан	+	-
L-рамноза, лактулоза D-манноза, меллибиоза, инозитол, D-маннитол, L-пролин, DL-лактат, трегалоза, гликоген, ацетат	-	+
Ферментативные активности:		
N-ацетил-β-глюкоамидаза, α-химотрипсин, α-галактозидаза, β-галактозидаза, β-глюкозидаза	-	+
Основные ЖК клеточных стенок (>20%)	C _{16:0} , C _{16:1ω6c} /C _{16:1ω7c}	C _{16:0} , C _{16:1ω6c} /C _{16:1ω7c} , C _{18:1ω7c}
Менахиноны	-	МК8 (100%)
Убихиноны	Q7 (2%), Q8 (98%)	Q7 (2%), Q8 (93%), Q9 (5%)
Основные полярные липиды	фосфадилэтаноламин, фосфадилглицерин, аминокфосфолипид	дифосфадилглицерин, фосфадилглицерин, фосфадилэтаноламин, фосфадилмонометилэтаноламин, аминокфосфолипид
Содержание Г+Ц пар в ДНК (мол%)	44.7	41.5

*-данные из Cramer *et al.*, 2011

Celerinatantimonas yamalensis (ya.mal.en'sis. N.L. fem. adj. yamalensis, посвящено полуострову Ямал, ссылаясь на место, откуда типовой штамм был выделен).

Клетки представляют собой палочки с закругленными концами, одиночными, в парах или в коротких цепях, размером 0.7-0.8 × 2-4 мкм. Колонии 0.5-1.5 мм, круглые, с ровным краем, гладкие, выпуклые, блестящие, непигментированные. Температура роста находится в пределах от 0 до 34°С с оптимумом при 18-22°С. Рост наблюдается при концентрациях NaCl от 20 до 120 г/л (0.34-2.1 М) с оптимальной концентрацией NaCl 20-80 г/л (0.34-1.38 М); при значениях pH от 5.5 до 7.5 (оптимальный – 6.0-6.2). Бактерии не

способен восстанавливать нитрат или продуцировать H_2S и индол. Желатин и Твин 80 гидролизуются, но агар, крахмал и хитин - нет. Для роста требуются дрожжевой экстракт (0.25-1.0%) или пептон (0.25-1.0%). Результаты теста на метиловый красный положительный, но на реакцию Фогеса-Проскауэра отрицательный. Кислоту образует из D-глюкозы, целлобиозы, раффинозы, арабинозы и D-фруктозы, но не из мальтозы или лактозы. Положительная реакция наблюдалась в следующих ферментативных тестах APY ZYM: щелочная и кислая фосфатазы, лейцин-ариламидаза, эстераза (C4), липаза эстераза (C8), нафтол-AS-BI-фосфогидролаза. Отрицательная реакция наблюдалась для липазы (C14), валинариламидазы, цистинариламидазы, трипсина, α -химотрипсина, α -галактозидазы, β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, α -глюкозидазы, β -глюкозидазы, N-ацетил- β -глюкозаминидазы, α -маннозидазы, α -фукозидазы, аргининдезаминазы, лизинкарбоксилазы и орнитиноксилазы. Штамм чувствителен к тетрациклину (30 мкг/мл) и устойчив к ампициллину (50 мкг/мл), линкомицину (2 мкг/мл), гентамицину (10 мкг/мл), полимиксину В (300 мкг/мл), ванкомицину (30 мкг/мл), эритромицину (15 мкг/мл), пенициллину G (2000 мкг/мл), хлорамфеникол (100 мкг/мл), бацитрацин (100 мкг/мл) канамицин (30 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл). Следующие субстраты используются в качестве единственного источника углерода: D-глюкоза, раффиноза, арабиноза, D-фруктоза, мальтоза, лактоза, сахароза, целлобиоза, ксилан, дульцит, сорбит, глицерин, сукцинат, fumarat, L-малат, пируват, цитрат, D-глюконат, N-ацетилглюкозамин. Рост не наблюдается на D-галактозе, D-маннозе, меллибиозе, D-рибозе, L-рамнозе, D-ксилозе, целлюлозе, метаноле, бутаноле, *мио*-инозитоле, этаноле, ацетате, формиате, бутирате, капроате, гептаноате, fumarate, малат, DL-лактате, L-треонине, L-пролине, L-тирозине, L-глутамине, гистидине, аспарагине, DL-аргинине, L-фенилаланине, L-валине, L-цистеине, L-орнитине, L-лейцине, глицине, L-лизине, L-аланине, DL-метионине, DL-триптофане, DL-серине, хитине, глутатионе. Основной хинон дыхательной цепи убихинон Q-8. Преобладающими жирными кислотами являются $C_{16:0}$, $C_{16:1} \omega 7$, $C_{18:1} \omega 7$ и $C_{17:1}$ сус. Типовой штамм $C7^T$ (= DSM 21888^T = VKM B-2511^T) был выделен из рассола в толще многолетнемерзлых отложений на полуострове Ямал, Север Сибири, Россия. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 44.7 мол%. Последовательности генов 16S рРНК и *nifH* депонированы в GenBank под номерами FJ039852 и FJ701923, соответственно.

6.4 Бактерии рода *Psychrobacter*

Предварительный микробиологический анализ исследованных криопэггов показал, что основную часть аэробной популяции составляли грамотрицательные непигментированные кокки и коккобациллы, численность которых в среднем по скважинам составляла около 2×10^3 кл/мл (Bakermans *et al.*, 2003).

Выделение. Из образцов воды криопэга, вскрытого скажиной 14/99 на Колымской низменности, при посеве на агаризованную среду R2A нами были выделены три аэробных штамма 1pS, 2pS и 3ps (Гиличинский *и др.*, 2003), два из которых (1pS и 2pS) росли в анаэробных условиях. Уровень ДНК-ДНК гибридизации между штаммами 1pS и 2pS составил 89%, на основании чего они могут быть отнесены к одному виду. Штамм 3ps по данным филогенетического анализа гена 16S рРНК был отнесен к виду *Psychrobacter maritimus* (Romanenko *et al.* 2004). В дальнейшем подробно был исследован штамм 2pS^T.

Морфология и ультраструктура. Колонии, полученные на твердой среде, были белого цвета, выпуклые, с ровным краем и диаметром 3-5 мм. Клетки штамма 2pS^T представляли собой кокки и коккобациллы шириной 0.5-1.0 мкм и длиной 0.5-2.0 мкм (рис. 22, а, б) и окрашивались по Граму отрицательно. Грамотрицательный тип строения клеточной стенки был подтвержден при изучении микрофотографий ультратонких срезов клеток (рис. 22, в).

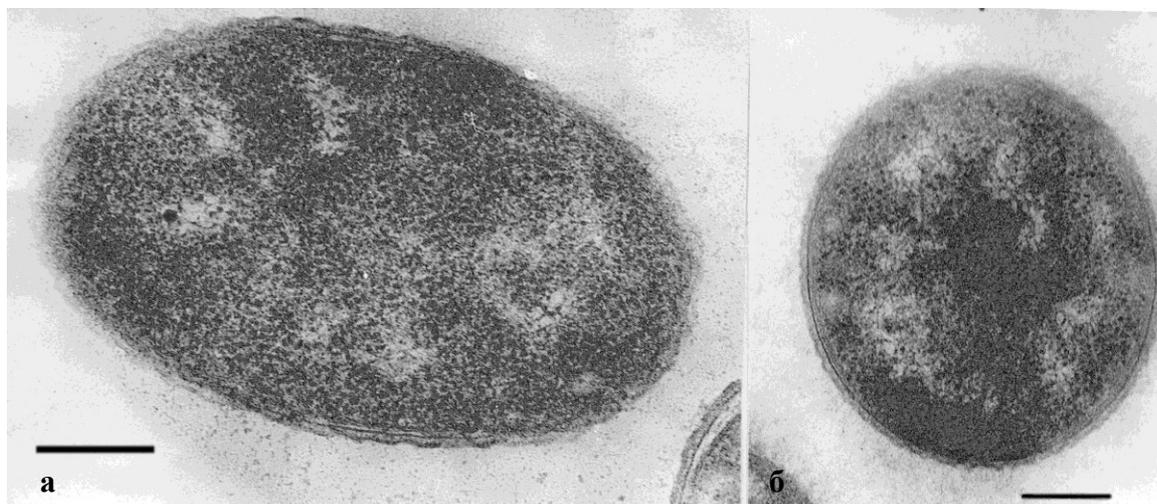


Рисунок 22. Ультратонкие срезы клеток штамма 1pS (а) и 2pS^T (б). Величина масштабной метки 1 мкм.

Физиолого-биохимические характеристики. Изолят рос в температурных границах от -2 до 37°C, при оптимуме 16-20°C. Проверка возможности роста штамма при отрицательных температурах показала, что штамм 2pS^T был способен расти при -2°C со временем удвоения 50 ч.

Добавление NaCl в среду культивирования стимулировало рост штамма 2pS^T. Оптимальный рост наблюдался при концентрации 8 г/л NaCl. При оптимальной температуре роста изолят был толерантен к содержанию до 60 г/л NaCl в среде культивирования.

Спектр утилизируемых субстратов. Из протестированных соединений через 48 часов рост наблюдался на дрожжевом экстракте, ряде органических кислот (пируват, глутарат, фумарат, капроат, гептаноат, бутират, малат, DL-лактат, цитрате), а также некоторых аминокислотах (L-пролин, L-тирозин) и спиртах (метанол, бутанол, дульцит). В оптимальных условиях рост не наблюдался на гистидине, аспарагине, L-глутамине, L-фенилаланине, L-валине, L-цистеине, L-лейцине, глицине, DL-метионине, DL-триптофане, DL-серине, сукцинате, лактате, формиате, сорбите, инозите, этаноле, пропаноле, и глицерине. Факторов роста не требовалось. Исследуемые штаммы не утилизировали ксилозу, агарозу, галактозу, мальтозу, глюкозу, арабинозу, маннозу, сахарозу, рибозу, рамнозу, фруктозу, D-раффинозу, мелибиозу. Остальные свойства перечислены в описании вида.

Генотипические свойства и таксономическое положение. Состав ГЦ-пар в ДНК штамма 2pS^T составил 46.0 мол.%. Мы определили почти полную последовательность гена 16S рРНК (1478 нуклеотидов) штамма 2pS^T (ВКМ В-2270^T).

Филогенетический анализ полученной последовательности показал, что исследуемый штамм наиболее близок (97% сходства) к *P. nivimaris* (AJ313425), галотолерантной психротрофной бактерии, выделенной из антарктического морского льда (Heuchert et al., 2004).

Уровень ДНК-ДНК гибридизации штамма 2pS^T с *P. nivimaris* DSM 16093^T составил 25%, с *P. glacincola* DSM 12194^T - 10%, а с типовым видом рода *P. immobilis* DSM 7229^T - 57%.

Предложение нового вида рода *Psychrobacter*. Со времени описания в 1983 г. *P. immobilis*, первого вида нового рода *Psychrobacter*, описано более 30 видов этого рода. Многие из них выделены из морских местообитаний с постоянно низкой температурой. В 2006 году появились описания двух новых видов *P. cryohalolentis* и *P. arcticus*, изолированных из вечномерзлых отложений Сибири (Bakermans et al., 2006).

Анализ морфологических, физиологических и биохимических признаков описываемой бактерии указывают на ее принадлежность к роду *Psychrobacter*. Как большинство представителей этого рода, штамм 2pS^T аэробом, не образует пигментов, каталазо- и оксидазоположительный, психротрофный и умеренно галофильный. Он не

образует индол и H_2S , не гидролизует крахмал и желатину, не содержит лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу, но

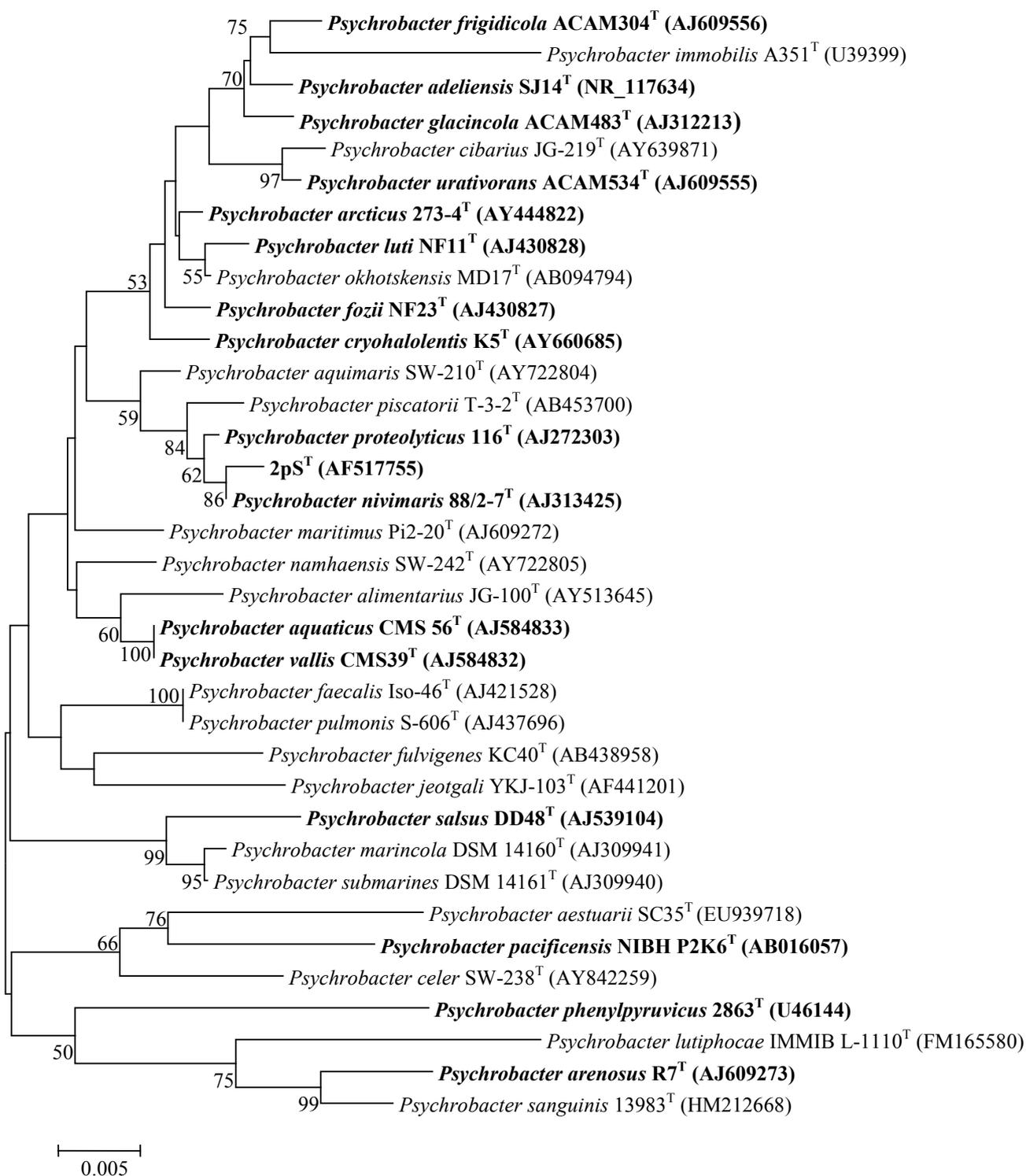


Рис. 23. Филогенетическое древо, показывающее положение штамма 2pS^T среди видов рода *Psychrobacter*, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Длина масштабной линейки: 0.5 замен на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “neighbour-joining”. Данные “bootstrap”-анализа указаны в точках ветвления. Жирным шрифтом выделены бактерии, выделенные из холодных мест обитания.

гидролизует Tween 80. Присутствие в липидном профиле значительного количества олеиновой кислоты также является характерной особенностью рода *Psychrobacter*.

Выделенный нами психрофильный арктический изолят 2pS^T оказался филогенетически наиболее близок к *P. nivimaris*, выделенному из вод Южного океана вблизи Антарктиды (Heuchert *et al.* 2004). Однако уровень ДНК-ДНК гибридизации выделенных штаммов и *P. nivimaris* составил всего 25%. На основании анализа гено - и фенотипических признаков новых изолятов мы предложили новый вид этого рода: '*Psychrobacter muriicola*' sp. nov. с типовым штаммом 2pS^T.

***Psychrobacter muriicola* sp.nov.** [mu.ri.i.co'la. L. n. muria, brine; L. suf. -cola (from L. n. incola), inhabitant; N.L. n. muriicola, inhabitant of brine].

Клетки представляют собой грамотрицательные кокки или коккобациллы, неспорообразующие, одиночные, в парах или коротких цепочках, диаметр 1-1.5 мкм, ширина 0.5-1.0, длина 0.5-1.8 мкм, неподвижны. Образуют белые плоские колонии диаметром 2-3 мм. Строгий аэроб, не смотря на то, что выделен из анаэробной накопительной культуры. Хемоорганотроф. Реакция на оксидазу и каталазу положительна. Оптимальный рост наблюдался при температуре 18-20°C, максимальная температура роста 37°C, минимальная – -2°C. Диапазон pH от 5.8 до 8.5 (оптимум 6.5-7.5), солености от 0 до 100 г/л, оптимум при 3-8 г/л NaCl. Не образует кислоту из углеводов. Положительный результат дали тесты на фенилаланиндезаминазу, нитратредуктазу и уреазу. Отрицательные результаты дали тесты на аргининдезаминазу, лизиндекарбокксидазу, орнитиндекарбокксилазу, гидролиз крахмала, образование индола и H₂S. Положительный результат дали тесты на щелочную и кислую фосфатазу, лейцинариламидазу, эстеразу (C4), эстеразу липазу (C8), нафтол-AS-BI-фосфогидролазу; отрицательный результат дали тесты на липазу (C14), валинариламидазу, цистинариламидазу, трипсин, α-химотрипсин, α-галактозидазу, β-галактозидазу, β-глюкуронидазу, α-глюкозидазу, β-глюкозидазу, N-ацетил-β-глюкозаминидазу, α-маннозидазу, α-фукозидазу.

В качестве единственного источника углерода и энергии служили дрожжевой экстракт, пируват, глутарат, фумарат, капроат, гептаноат, бутират, малат, DL-лактат, цитрат, L-пролин, L-тирозин, метанол, бутанол, дульцит). В оптимальных условиях рост не наблюдался на гистидине, аспаргине, L-глутамине, L-фенилаланине, L-валине, L-цистеине, L-лейцине, глицине, DL-метионине, DL-триптофане, DL-серине, сукцинате, лактате, формиате, сорбите, инозите, этаноле, пропаноле и глицерине, ксилозе, агарозе, галактозе, мальтозе, глюкозе, арабинозе, маннозе, сахарозе, рибозе, рамнозе, фруктозе, D-

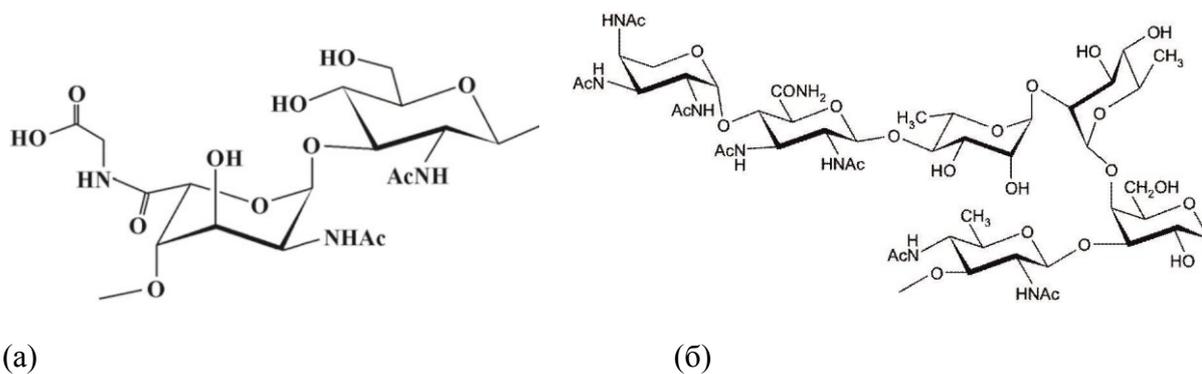
раффинозе, мелибиозе. Факторы роста не требовались. Основная жирная кислота клеточной стенки при оптимальной температуре роста C_{18:1}.

Типовой штамм 2pS^T (=VKM В-2270^T = IMB В-7124^T) выделен из криопэга, Колымская низменность, Россия. Г+Ц содержание в ДНК типового штамма составляет 46.0 мол. %.

6.4.1 Биотехнологический потенциал арктических *Psychrobacter* spp.

В последнее время широко распространенные в холодных экосистемах бактерии рода *Psychrobacter* все чаще привлекают внимание исследователей как перспективные агенты для использования в биотехнологии. Так, в геноме *P. cryohalolentis* K5^T идентифицированы гены потенциальных липолитических ферментов, проведены амплификация и клонирование трех генов, кодирующих холодоактивные липолитические ферменты (Петровская и др., 2012; Novototskaya-Vlasova et al., 2012a). Функциональная характеристика полученных рекомбинантных белков показала, что EstPc обладает максимальной активностью в отношении C₄ - субстратов, в то время как для белков Lip1Pc и Lip2Pc характерна высокая липолитическая активность в отношении C₁₂-C₁₆ - субстратов. Все выделенные белки демонстрировали высокую липазную активность при низких температурах (Novototskaya-Vlasova et al., 2012b).

Проведенное нами исследование особенностей штаммов *Psychrobacter* spp., выделенных из криопэгов показало, что клеточные полисахариды изолятов включают ранее неизвестные природные соединения (Kondakova et al., 2012; 2012a; 2012b).



→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpNAcA-(1→3)-α-D-QuipNAc4NHb-(1→3)-β-D-QuipNAc4NHb-(1→

(v)

Рис. 24. Новые структуры O-полисахаридов, выявленные в клеточных стенках *Psychrobacter* spp.: (a) *P. muriicola* 2pS^T; (б) *P. cryohalolentis* K5^T; (в) *P. maritimus* 3ps.

Если структура кислого полисахарида (рис. 24, в), входящего в состав клеточной стенки *P. maritimus* 3ps напоминала подобную структуру, обнаруженную в клетках *Pseudomonas*

fluorescens IMV 247 (Shashkov et al., 1998), то компоненты, выявленные в клетках *P. muriicola* 2pS^T и *P. cryohalalensis* K5^T (рис. 24, а, б), были абсолютно уникальны.

Таблица 20. Антифризная и липазная активность клеточных экстрактов психрофильных и психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых отложений Арктики и Антарктики и криопэггов.

N/п	Название	Температурный оптимум, °С	Антифризная активность	Липазная активность, ед/мл
1.	<i>Clostridium algorithilum</i> 14D1 ^T	5-6	-	62.3
2.	' <i>Clostridium frigoriphilum</i> ' 14F ^T	5-6	-	46.6
3.	<i>Clostridium tagluense</i> A121 ^T	16-18	+	18.8
4.	<i>Clostridium frigoris</i> ВКМ В-2735 ^T	5-7	-	12.1
5.	<i>Clostridium lacusfryxellense</i> VKM В-2736 ^T	8-12	-	23.8
6.	<i>Clostridium bowmanii</i> VKM В-2737 ^T	12-16	-	34.8
7.	<i>Clostridium psychrophilum</i> VKM В-2738 ^T	4	-	23.4
8.	<i>Clostridium estertheticum</i> VKM В-2739 ^T	6-8	-	65.5
9.	<i>Celerinatantiomonas yamalensis</i> C7 ^T	18-22	-	54.1
10.	' <i>Psychrobacter muriicola</i> ' 1pS	16-18	-	137.6
11.	' <i>Psychrobacter muriicola</i> ' 2pS ^T	18-20	-	142.6
12.	<i>Psychrobacter maritimus</i> 3ps	24	-	99.6
13.	<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4 ^T	22	-	128.5
14.	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 ^T	22	-	130.1
15.	<i>Psychrobacter immobilis</i> DSM 7229 ^T	29-31	-	82.5
16.	<i>Psychrobacter glacincola</i> DSM 12194 ^T	13	-	167.7
17.	<i>Psychrobacter nivimaris</i> DSM 16093 ^T	15	-	112.8
18.	<i>Desulfovibrio arcticus</i> B15 ^T	24	-	13.7
19.	<i>Methanosarcina mazei</i> JL01	28	-	н.о.
20.	<i>Methanobacterium arcticum</i> M2 ^T	24-28	-	н.о.
21.	<i>Methanobacterium veterum</i> MK4 ^T	28	-	н.о.
22.	<i>Carnobacterium funditum</i> DSM 5972 ^T	22	-	25.0
23.	<i>Carnobacterium alterfunditum</i> DSM 5970 ^T	22	-	28.0

Мы также определили липазную активность в клетках штаммов анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, выделенных из постоянно холодных мест обитания (табл. 20). Наибольшие значения (167.7 ед/мл) были получены для факультативно-анаэробной бактерии *P. glacincola*, выделенной из антарктического льда (Bowman *et al.*, 1996). Выделенные нами штаммы бактерий рода *Psychrobacter* (*P. muriicola* 1pS и 2pS^T, *P. maritimus* 3ps) также характеризовались значительной величиной липазной активности (99.6 - 142.6 ед/мл) и могут считаться перспективными объектами для применения в биотехнологии.

Биотехнологический потенциал бактерий рода *Psychrobacter* далеко не исчерпывается холодоактивными ферментами и до конца не изучен. Например, показано, что три антарктических штамма продуцируют антибиотики направленного против грамотрицательных бактерий действия (Fondi *et al.*, 2014).

6.5 Описание бактериального спутника *Methanosarcina* sp., выделенной из вечной мерзлоты

Штамм GLS2^T был выделен нами из метаногенной бинарной культуры и, несмотря на бактериальную природу, был устойчив к действию широкого спектра антибиотиков, используемых при выделении метанобразующих архей. Эти ассоциированные с *Methanosarcina* sp. штамм JL01 бактерии несколько лет находились в условиях минеральных метаногенных сред, где источником углерода служил ацетат или метанол. Методом клонирования бактериальный спутник был идентифицирован как представитель рода *Sphaerochaeta*, что позволило подобрать необходимые условия для получения его чистой культуры методом предельных разведений в жидкой среде и последующим получением отдельных колоний на твердой среде. Штамм GLS2^T образовывал на твердой среде круглые рыхлые палевые колонии диаметром 2-3 мм.

Микроскопические исследования показали, что новая бактерия представляла собой неподвижные клетки сферической или овальной формы, размерами от 0.2 до 1-2 мкм, часто объединяющиеся в агрегаты различных размеров, напоминающие шары (рис. 25, а). Подобные структуры, состоящие из нескольких десятков клеток, были особенно заметны в экспоненциальной фазе роста культуры, в то время как в стационарной фазе роста культура находилась в виде индивидуальных клеток. Также отмечались одиночные яркие сферические тела размером около 4 мкм. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) удалось выявить другой тип морфологии, а именно, клетки в виде колец (Рис. 25, б), а также определить грамотрицательный тип клеточной стенки (Рис. 25, г).

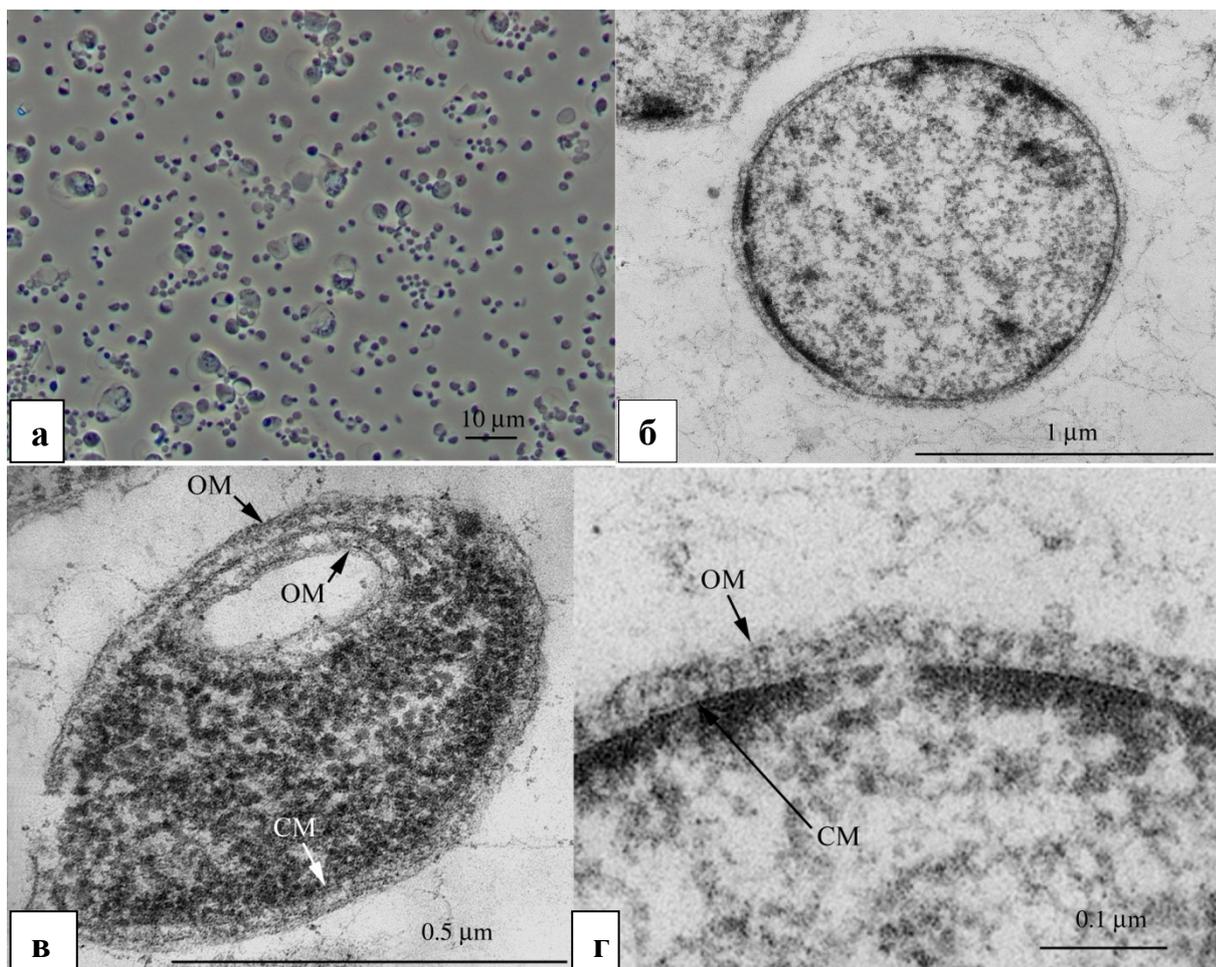


Рис. 25. Микрофотографии клеток штамма GLS2^T: фазовый контраст (а); трансмиссионный электронный микроскоп, негативно окрашенные ультратонкие срезы – коккоидные клетки (б), клетка в виде кольца (в), клеточная стенка (г). Условные обозначения: СМ- клеточная мембрана; ОМ – наружная мембрана.

Штамм GLS2^T, как и другие виды этого рода *S. globosa* Buddy^T и *S. pleomorpha* Grapes^T, рос в присутствии ампициллина. Секвенирование геномов нашего штамма, а также штаммов Buddy^T и Grapes^T показало отсутствие нескольких генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки, участвующие в процессах трансгликозилирования и транспептидации на заключительных стадиях синтеза пептидогликана (Caro-Quintero *et al.*, 2012). По-видимому, штаммы Buddy^T и Grapes^T, а также наш изолят GLS2^T синтезируют нежесткую дефектную клеточную стенку, которая определяет сферическую разнообразную морфологию. Эти бактерии могут рассматриваться как стабильные организмы L-формы сферопластного типа. Электронная микроскопия клеток GLS2^T, выращенных с ампициллином в обычной основной солевой среде, показала многочисленные формы без явной клеточной стенки (рис. 26). Некоторые из этих клеток имели очень небольшие размеры (около 100 нм) и, по-видимому, были образованы путем экстрюзии мембраны (рис. 26, А) с образованием визикул, приводящим к мелким вздутиям

(рис. 26, Б). Такой механизм распространения клеток был ранее предложен для L-форм грамположительной бактерии *B. subtilis* (Leaver *et al.*, 2009) и как возможный способ деления клеток на ранних этапах эволюции перед возникновением клеточной стенки. Клетки GLS2^T, выращенные в присутствии ампициллина, могли проходить через стерильную мембрану размером пор 0.22 мкм, после чего наблюдался рост культуры.

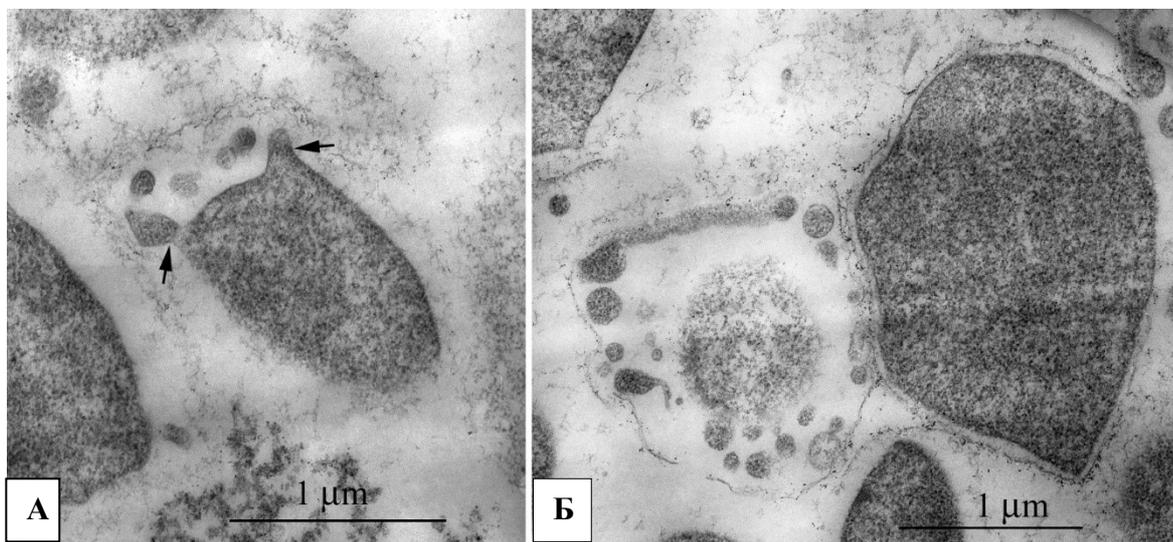


Рис. 26. Ультратонкие срезы клеток штамма GLS2^T, выращенные с ампициллином.

Нами была получена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма GLS2^T (1504 п.о.). Сравнение нуклеотидной последовательности штамма GLS2^T с имеющимися последовательностями генов 16S рРНК в GenBank показало, что исследуемый штамм образует единый кластер с представителями рода *Sphaerochaeta* и имеет наибольшее сходство (99.3%) с *S. globosa* Buddy^T (рис. 27).

Исследование физиологических и биохимических свойств штамма GLS2^T показало, что бактерия не росла под ватной пробкой или в микроаэрофильных условиях. Хороший рост наблюдался только при добавлении в среду восстановителей, поэтому штамм GLS2^T является строгим анаэробом. Культура росла в диапазоне температур от 20 до 40°C, с оптимумом при 30-34°C. Оптимальное значение рН для роста составляло 6.8-7.5, однако рост также наблюдался при рН от 5.7 до 8.2. Штамм GLS2^T нуждался в 0.02-0.03 М NaCl для оптимального роста. Присутствие NaCl в концентрации 0.08 М и выше ингибировало рост.

В качестве источников углерода и энергии для роста новая бактерия использовала моно-, ди- и трисахариды. Штамм не использовал в качестве единственного источника углерода для роста фруктозу, целлюлозу, ксилан или дрожжевой экстракт, слабо рос на лактозе, сахарозе крахмале и глюкозе. Штамм рос на лактате и глюкуроновой кислоте, но

не мог использовать другие органические кислоты (малат, цитрат, пируват, бензоат, фумарат, пропионат, ацетат), также как этанол, метанол, триметиламин, галактозамин и H_2+CO_2 .

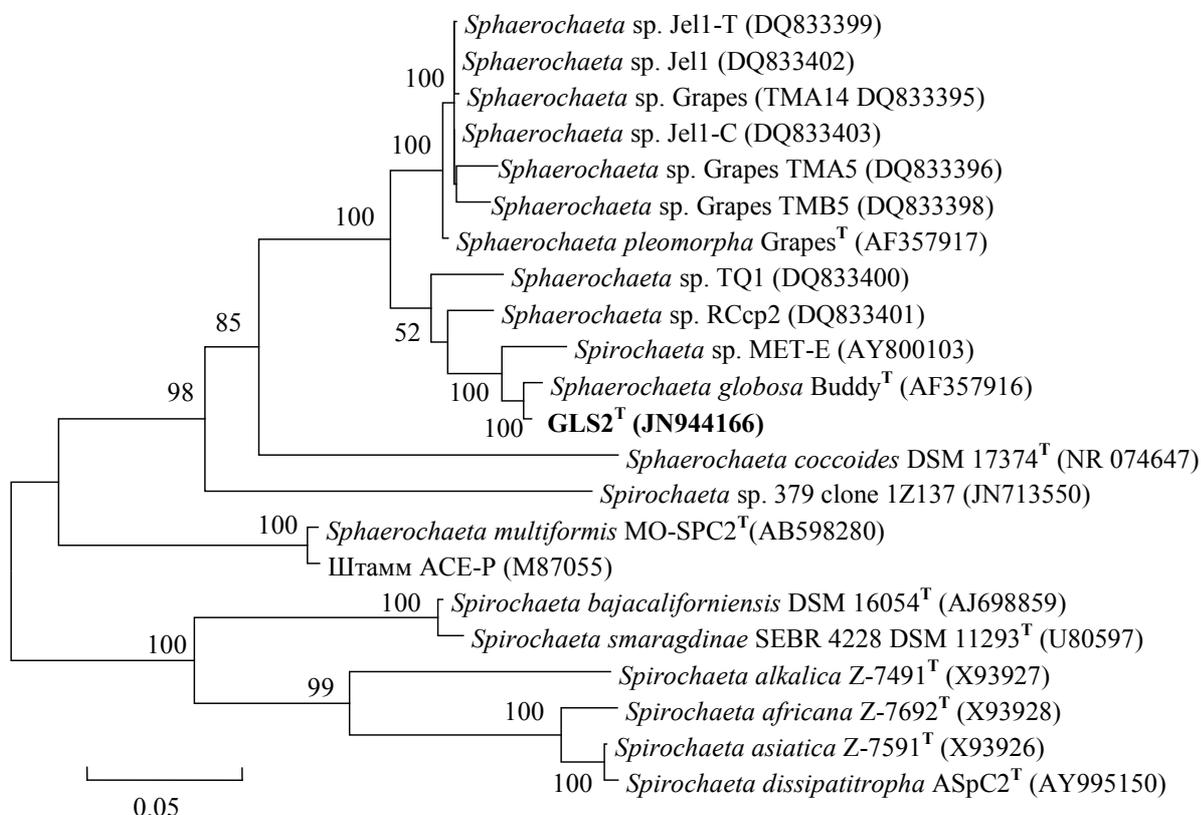


Рис. 27. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения генов 16S рРНК изолятов, относящихся к родам *Sphaerochaeta* и *Spirochaeta*, и показывающее положение штамма GLS2^T. Степень ветвления была получена методом “neighbor-joining”. Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Для роста на всех субстратах требовался дрожжевой экстракт. Также как *S. globosa* штамм Buddy^T (Ritalahti *et al.*, 2012), при росте на ксилозе изолят мог восстанавливать цитрат Fe(III) или EDTA-Fe(III) до Fe(II). При росте на ксилозе штамм GLS2^T не восстанавливал сульфат, тиосульфат, сульфит и нитрат. Кроме того, сульфит полностью ингибировал его рост.

Анализ полярных липидов клеток штамма GLS2^T показал, что в их состав входят гликолипиды, фосфолипиды и фосфогликолипиды (рис. 28, а). Однако, липидный профиль исследуемого штамма в значительной степени отличался от липидного профиля близкородственного штамма Buddy^T (рис. 28, б) и других представителей рода *Sphaerochaeta* (Miyazaki *et al.*, 2014). Изопреноидные хиноны в дыхательной цепи не были обнаружены. Нами были определены ферментные активности штаммов GLS2^T и Buddy^T с помощью тестов API ZYM.

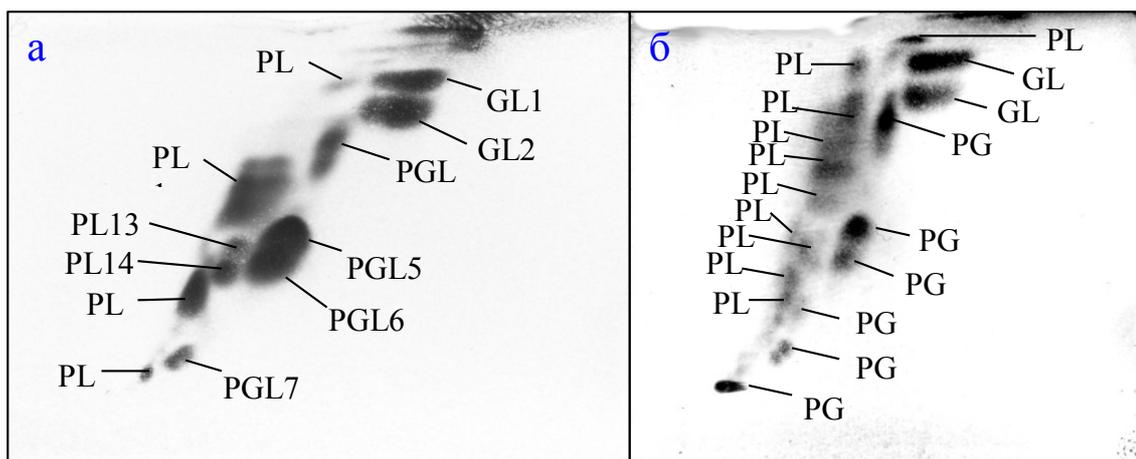


Рис. 28. Тонкослойная хроматограмма экстрактов полярных липидов из: а – *S. globosa* Buddy^T, б – штамм GLS2^T. GL – неидентифицированные гликолипиды; PL – неидентифицированные фосфолипиды; PGL – неидентифицированные фосфогликолипиды.

Оба штамма характеризовались высокой активностью щелочной и кислой фосфатаз, нафтол-AS-BI-фосфогидролазы и α -галактозидазы и слабой активностью β -галактозидазы. В тоже время, штамм Buddy^T проявлял слабую эстеразную и эстераза липазную активности, а штамм GLS2^T – высокую активность валинариламидазы.

Основными жирными кислотами клеточных стенок штамма GLS2^T были C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:0} 3-ОН и C_{16:1}. Также были обнаружены диметилацетали C_{16:0} DMA и C_{16:1} DMA (Приложение 3, табл. 2). Интересным оказался факт, что C_{16:0} DMA составляет около 20% всех жирных кислот как в клеточных стенках штамма GLS2^T, так и штамма Buddy^T. Другим важным компонентом был C_{16:0} 3ОН (16%). Жирнокислотный профиль штамма GLS2^T отличался от профиля штамма Buddy^T отсутствием или низким содержанием C₁₈ жирных кислот, таких как C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:1} DMA.

Содержание Г+Ц пар в ДНК штаммов GLS2^T и Buddy^T составило 47.2 и 48.9 мол%, соответственно. Уровень ДНК-ДНК гибридизации (34.7 ± 8.8%) показал, что штаммы относятся к разным видам.

На основании сравнения морфологических, физиологических, генотипических и филогенетических свойств штамма GLS2^T и типовых штаммов других видов рода *Sphaerochaeta* (табл. 21) нами был предложен новый вид *Sphaerochaeta associata*.

Таблица 21. Дифференциальные свойства штамма GLS2^T и типовых штаммов видов рода *Sphaerochaeta*.

Все штаммы не содержат каталазу и оксидазу, имеют грамотрицательный тип клеточной стенки, ассимилируют D-ксилозу.

Свойства	GLS2 ^T	<i>S. globosa</i> Buddy ^T	<i>S. pleomorpha</i> Grapes ^T	<i>S. coccoides</i> SPN1 ^T
Морфология	Плеоморфные кокки	Кокки	Плеоморфные кокки	Кокки
Температура, (°C):				
диапазон	20-40	20-37	15-30	15-40
оптимум	30-34	30	20-25	30
pH:				
диапазон	5.7-8.2	н.о.	н.о.	5.5-9.5
оптимум	6.8-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	7.4
Оптимум NaCl, г/л	1-1.5	1	1	1
Основные жирные кислоты	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:0} 3-OH; C _{16:0} DMA; C _{16:1} ; C _{16:1} DMA	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:1} ; C _{18:1} ; br-C _{17:1}	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:1} ; br-C _{17:1}	*C _{14:0} ; C _{16:0} ; iso-C _{16:0}
Содержание Г+Ц пар в ДНК (мол.%)	47.2	48.9	46.2	50.6
Источник выделения	<i>Methanosarcina</i> sp. JL01	Пресноводные отложения	Пресноводные отложения	Толстый кишечник термита <i>Neotermes</i> <i>castaneus</i>

*Данные из Miyazaki *et al.*, 2014;

Sphaerochaeta associata (as.so.ci.a'ta. N.L. fem. part. adj. *associata*, значит, выделен из бинарной культуры с *Methanosarcina* sp. JL01)

Клетки грамотрицательные неподвижные, кокковидные, иногда в виде кольца размером 0.2-4.0 мкм. Штамм анаэробный оксидазо- и каталазоотрицательный, хемоорганогетеротроф. Образует кислотные и щелочные фосфатазы, нафтол-AS-BI-фосфогидролазу, α-галактозидазу, валинариламидазу. Для роста использует моно-, ди- и трисахариды. Требуется дрожжевой экстракт для роста на всех субстратах. Не растет на фруктозе, целлюлозе, ксилане, дрожжевом экстракте, а также на ряде органических кислот, этаноле, метаноле, триметилаmine и H₂+CO₂. Рост наблюдался при температуре 20-40°C (оптимальная температура 30-34°C), при pH 5.7 – 8.2 (оптимальный pH 6.8-7.5) и оптимальной концентрации NaCl 0.02-0.03 М. Штамм устойчив к ампициллину,

карбенициллину, цефепиму, ванкомицину, рифампицину, стрептомицину и чувствителен к канамицину, эритромицину и тетрациклину.

Типовой штамм GLS2^T (=DSM 26261^T = VKM B-2742^T) был выделен из бинарной культуры с *M. mazei* JL01. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 47.2±0.8 мол%. Последовательность гена 16S рРНК депонирована в GenBank под учетным номером JN944166.

6.5.1 Геномика бактерий рода *Sphaerochaeta*

Для того, чтобы получить объяснение причин тесного взаимодействия метаногена и бактерии – спутника, был секвенирован и аннотирован геном *S. associata* GLS2^T. Мы проанализировали данные геномного секвенирования штамма GLS2^T и сравнили их с геномами других сферохет, выделенных к настоящему моменту – *S. globosa*, *S. coccoides* и *S. pleomorpha*. Это сравнение продемонстрировало значительное различие в наборе генов (табл. 22). Показано, что в геноме сферохет отсутствует ряд генов, кодирующих пенициллин связывающие белки, участвующие в последних этапах синтеза пептидогликана, а также большой группы генов, ответственных за хемотаксис и подвижность (табл. 22 и рис. 29). У бактерии присутствуют гены, кодирующие белки метаболизма хондроитина, аналога метанохондроитина – компонента каркаса метаносарцин. Помимо метанохондроитина, метаносарцина может обеспечить бактерию корриноидами, так как в геноме бактерии обнаружено только 4 гена для синтеза кобаламина (cobalamin salvage pathway), в то время как метаносарцина образуют большие концентрации кобамидов. Также метаносарцина для бактерии-спутника, являющейся ауксотрофом по многим аминокислотам, может быть источником аминокислот.

Таблица 21. Общая сравнительная характеристика геномов рода *Sphaerochaeta*

	<i>S. associata</i> GLS2 ^T		<i>S. globosa</i> Buddy ^T		<i>S. pleomorpha</i> Grapes ^T		<i>S. coccoides</i> SPN1 ^T	
	число	% от общего	число	% от общего	число	% от общего	число	% от общего
Общее количество оснований ДНК	3550837	100	3316466	100	3590853	100	2227296	100
Число кодирующих оснований	3278700	92.34	3070340	92.58	3267331	90.99	2021581	90.76
ГЦ содержание	1796792	50.60	1620901	48.87	1658877	46.20	1126077	50.56
Общее число генов	3310	100	3121	100	3283	100	1924	100
Гены, кодирующие белки	3251	98.22	3057	97.95	3216	97.96	1866	96.99
Гены РНК	59	1.78	64	2.05	67	2.04	58	3.01
рРНК	8	0.24	14	0.45	15	0.46	9	0.47
5S	4	0.12	6	0.19	7	0.21	3	0.16
16S	3	0.09	4	0.13	4	0.12	3	0.16
23S	1	0.03	4	0.13	4	0.12	3	0.16
тРНК	48	1.45	47	1.51	49	1.49	47	2.44
Гены белков с предсказанной функцией	2604	78.67	2273	72.83	2623	79.90	1538	79.94
Гены белков без функции	647	19.55	784	25.12	593	18.06	328	17.05
Гены, кодирующие ферменты	856	25.86	826	26.47	901	27.44	608	31.60
Гены белков в КОГ (COG)	2286	69.06	2137	68.47	2335	71.12	1345	69.91
КОГ кластеры	1186	51.88	1158	54.19	1217	52.12	935	69.52

Таблица 22. Гены флагелл и хемотаксиса в геномах представителей *Spirochaetales*.

Ген	Описание	Представители родов <i>Spirochaetales</i>				
		<i>Sphaerochaeta</i>	<i>Spirochaeta</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Treponema</i>	<i>Brachyspira</i>
<i>pbpC</i>	pbp 1C, транспептидаза/транс-гликозилаза	-	+	+	+	+
<i>mrcA/B</i>	pbp 1A, транспептидаза/транс-гликозилаза	-	+	+	+	+
<i>mrda</i>	pbp 2, транспептидаза	-	+	+	+	+
<i>pbpB</i>	pbp 3, белок клеточного деления FtsI	+	+	+	+	+
<i>dacA/C/D</i>	pbp 5/6, карбоксипептидаза	-	+	+	+	+

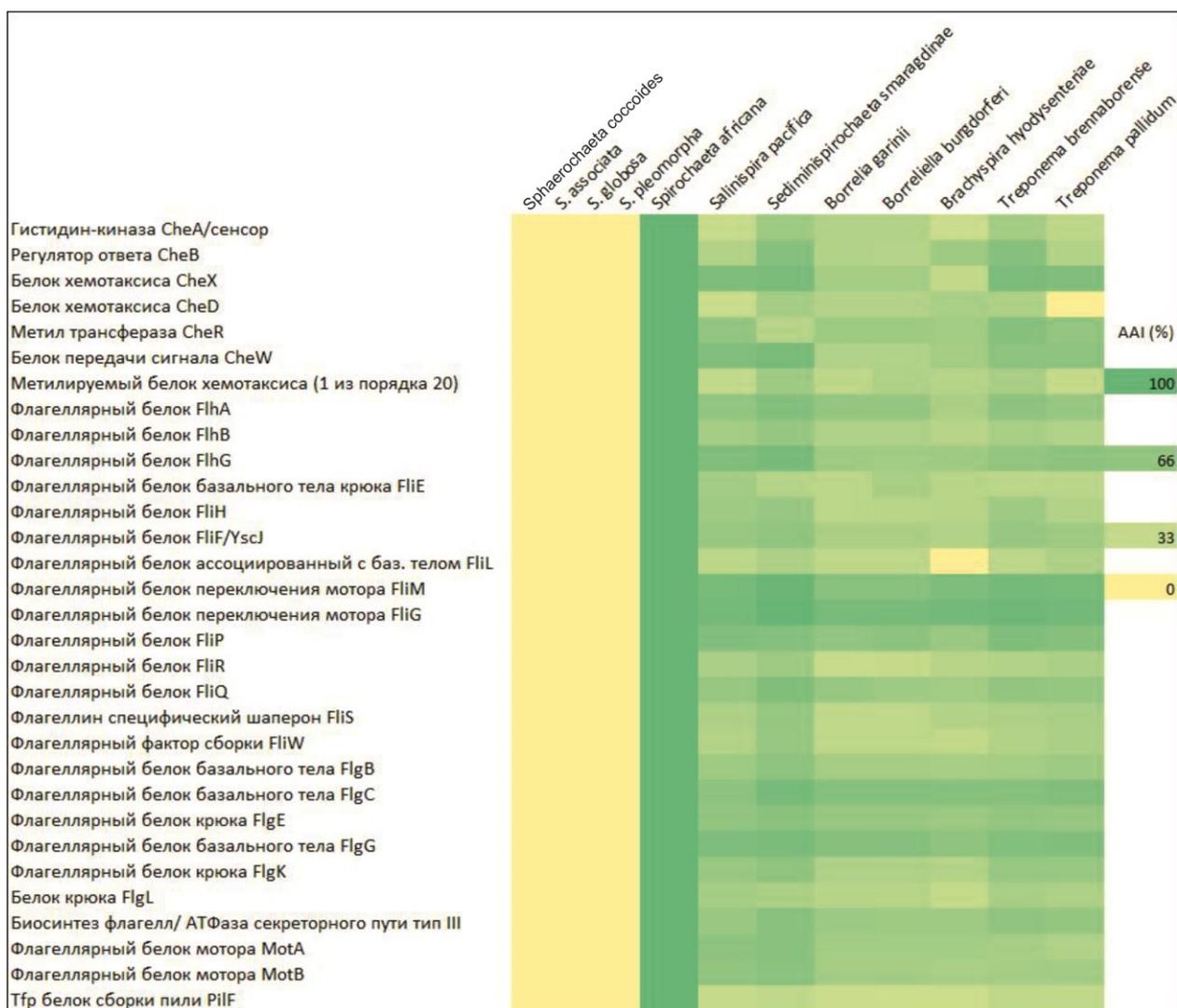


Рис. 29. Уровень аминокислотной идентичности (AAI) белков хемотаксиса и движения у ряда представителей *Spirochaetales*.

Сравнение функциональных профилей геномов *Sphaerochaeta* и некоторых других микроорганизмов (рис. 30) указывает на значительную долю в геномах сферохет группы генов метаболизма и транспорта углеводов. Кроме того, геномы представителей рода *Sphaerochaeta* кодируют широкий спектр транспортных белков и ферментов метаболизма уоновых кислот. Все это согласуется с характеристикой сферохет как анаэробных хемогетеротрофов-сахаролитиков.

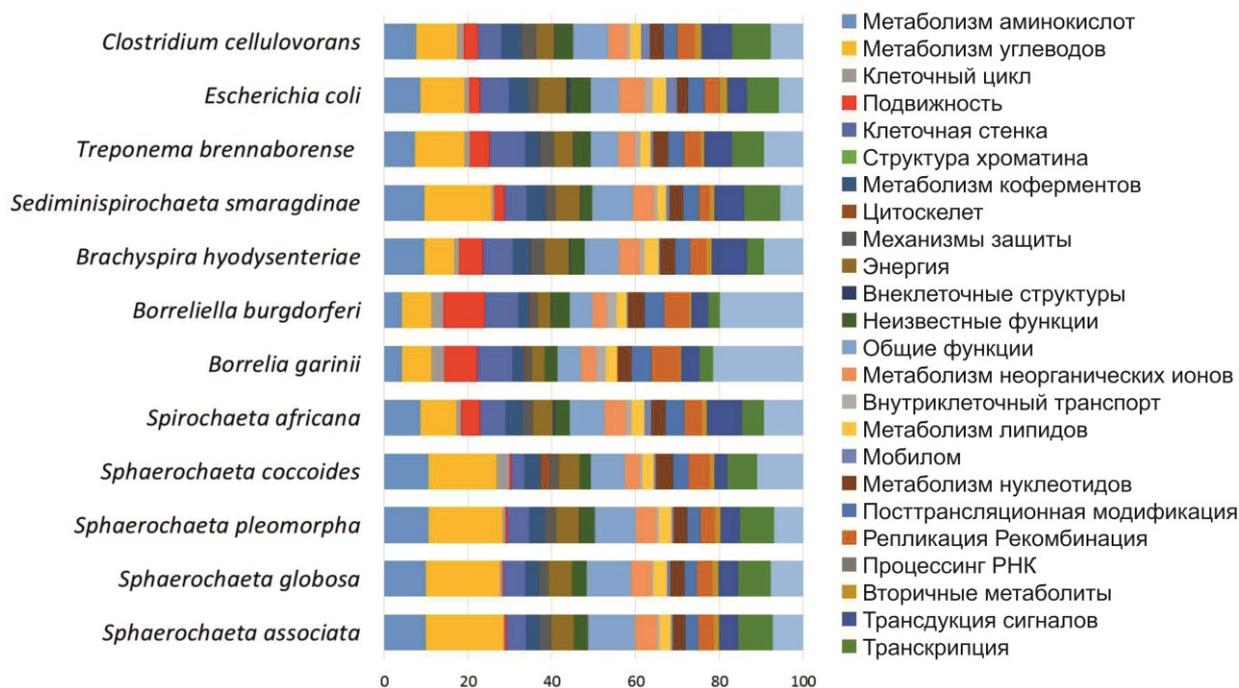


Рис. 30. Функциональная характеристика некоторых микробных геномов на основе базы данных COG.

В табл. 24 представлены семейства ферментов, проявляющих активность в отношении углеводов (CAZy семейства), которые были обнаружены в геномах *Sphaerochaeta*. Наиболее представлены в геномах семейства гликозил-гидролаз (GH), такие как β -галактозидазы (GH2), β -глюкозидазы (GH3), α -галактозидазы (GH4), глюкозидазы семейства GH13, α -ксилозидазы и α -глюкозидазы (GH31). В геномах сферохет есть гены ферментов деградации пектина (пектин эстераза (CE8), полигалактуроназа (GH28), рамногалактуронил гидролаза (GH105)), крахмала (GH13), хондроитина (хондроитин дисахарид гидролаза (GH88) и хондроитин АС/альгинат лиаза (PL12)). Геном *S. pleomorpha* кодирует также декстраназу (GH66).

Наличие генов деградации хондроитина, являющегося аналогом метанохондроитина метаносарцин, а также возможность получать предшественники для синтеза кобаламина от метаносарцины создают, по-видимому, основу для тесного сосуществования *S. associata* с метаносарциной. Для изучения взаимодействия *S. associata* с *M. mazei* JL01 предполагается оценить долю генов, полученных в результате горизонтального переноса, в геномах *S. associata* и JL01.

Таблица 24. CAZy семейства, представленные в геномах *S. associata* (1), *S. globosa* (2), *S. pleomorpha* (3), *S. coccoides* (4).

CAZy семейство	1	2	3	4	CAZy семейство	1	2	3	4	CAZy семейство	1	2	3	4
GH1	1	1	1	2	GH38	1	0	0	1	GH88	2	1	0	1
GH2	5	5	4	4	GH43	3	2	1	1	GH94	1	1	0	0
GH3	4	4	4	1	GH50	0	0	1	0	GH97	0	0	0	1
GH4	4	3	1	1	GH51	1	1	0	1	GH105	4	3	1	3
GH9	0	0	1	0	GH52	0	0	0	1	GH112	2	1	0	0
GH13	4	4	6	4	GH57	3	3	3	3	GH127	1	2	0	0
GH15	0	0	1	0	GH59	0	0	0	1	CE8	1	1	1	1
GH20	2	2	2	1	GH63	1	1	1	1	CE9	3	3	3	1
GH28	1	2	1	1	GH65	0	0	2	1	CE12	1	1	0	1
GH29	1	1	0	1	GH66	0	0	1	0	CE14	0	0	1	0
GH30	0	0	2	0	GH67	0	0	0	1	CE15	0	0	1	0
GH31	5	5	6	0	GH77	2	2	2	2	PL12	3	1	1	2
GH36	1	1	1	2	GH78	0	1	0	0	PL26	0	0	0	1

6.5.2. Влияние *S. associata* GLS2^T на рост и метаногенез *M.mazei* JL01

Мы проверили предположение о влиянии бактерии *S. associata* и ее клеточных экстрактов на рост и метаногенез чистых культур, как выделенных из многолетнемерзлых отложений, так и метаногенов, выделенных из наземных источников. Полученные результаты показали, что совместное культивирование штамма JL01 и сахаролитической бактерии *S. associata* штамм GLS2^T на среде для метаногенных архей (метанол в качестве субстрата) приводило к значительному увеличению продукции метана и сокращению лаг-периода (рис. 31).

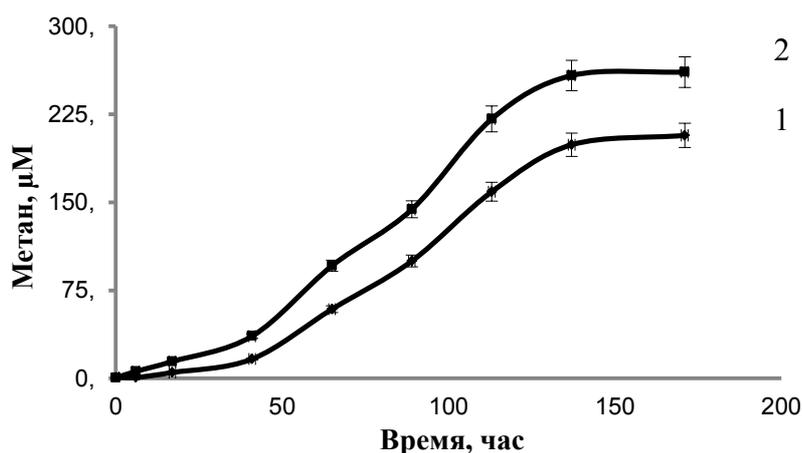


Рис. 31. Образование метана штаммом JL01 при росте на метаноле (1) и в присутствии *S. associata* штамм GLS2^T (2).

Подобное влияние *S. associata* на рост других метаногенов, как выделенных из мерзлоты (*M. arcticum* M2^T, *M. veterum* МК4^T), так и типовых видов родов *Methanobacterium* (*M. bryantii* М.о.Н.^T) и *Methanosarcina* (*M. mazei* S-6^T), не было установлено. В отличие от бактериальной культуры, экстракты клеток *S. associata*, полученные автоклавированием, не оказывали стимулирующего воздействия ни на один из исследованных штаммов метаногенов.

Увеличение скорости метаногенеза в таких совместных культурах может быть связано, например, с образованием сферохетой ацетата в процессе сбраживания компонентов клеточных стенок метаносарцины, который, в свою очередь, является субстратом для *Methanosarcina* spp. Метанобразующие археи, как известно, могут продуцировать предшественники витамина В₁₂ для других микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008). Ранее расшифрованный геном *S. globosa* Buddy^T (Caro-Quintero *et al.*, 2012) показывает, что эта бактерия не имеет полного набора генов для синтеза витамина В₁₂ и нуждается в его предшественниках. Таким образом, можно предположить, что *M. mazei* штамм JL01 получает преимущество в экосистеме многолетнемерзлых отложений от совместного сосуществования с бактериальным спутником, по физиологическим потребностям относящемся к микроорганизмам диссипотрофам.

6.6. Новые холодоустойчивые метаногены

Получение накопительных культур. Для получения чистых культур метаногенов накопительное культивирование проводили анаэробно во флаконах объемом 60 мл. Метаногенные культуры получали добавлением к ~10 граммам образца 5 мл анаэробной среды. Накопительные культуры инкубировали при температуре 5,15 и 20°C в течение длительного времени (не менее 12 месяцев). После достижения объемной концентрации метана не менее 40% (рис. 32), содержимое флакона переносили в пробирки Хангейта с добавлением 5 мл среды. Чистые культуры были получены МПР. В результате последовательных пересевов с добавлением антибиотиков на последних этапах было выделено четыре штамма метаногенов: водородиспользующий штамм M2 и ацетатиспользующий штамм JL01 из голоценовых ММО и водородиспользующие штаммы МК3 и МК4 – из плиоценовых ММО.

6.6.1 Метанобразующая сарцина из голоценовых мерзлых отложений

Методом длительного анаэробного культивирования при 15°C с использованием ацетата в качестве источника углерода в присутствии пенициллина и образцов голоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (северо-восток России, 70°06'N, 154°04'E) была получена бинарная метаногенная культура.

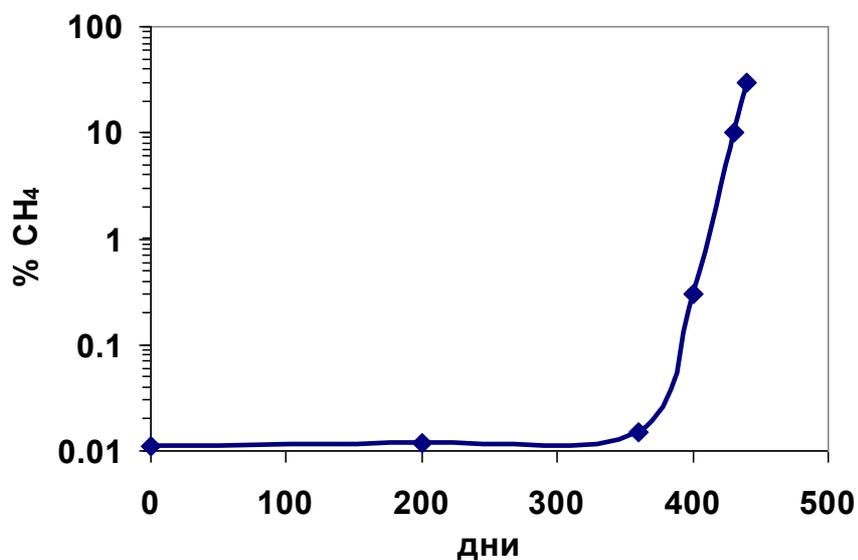
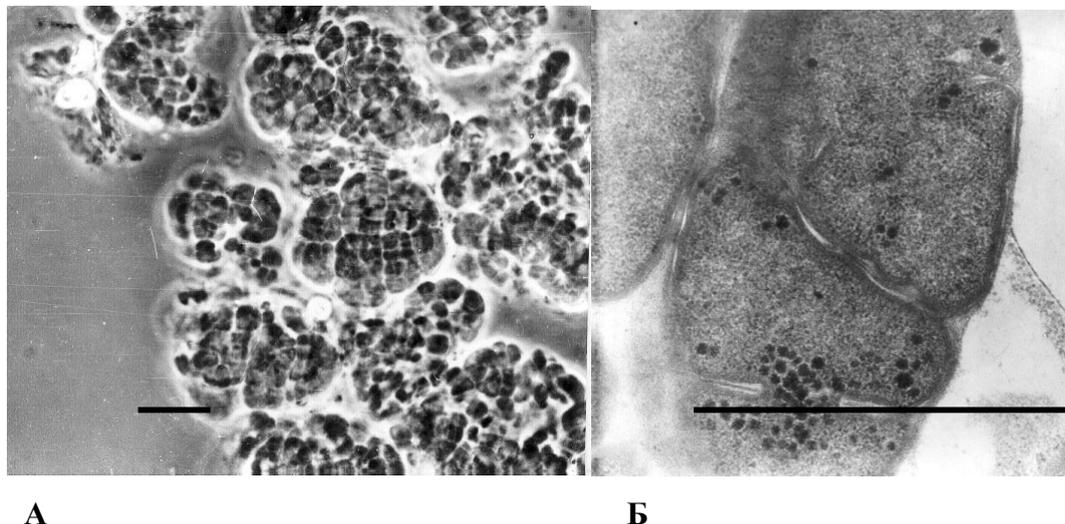


Рис. 32. Образование метана из CO₂ и H₂ в накопительной культуре из плиоценовой мерзлой осадочной породы (3.0 млн лет).

Впоследствии, методом клонирования был определен и выделен бактериальный спутник *S. associata* GLS2^T. Путем многократных пересевов с антибиотиками различных классов нам удалось получить чистую культуру метаногена, обозначенную нами как штамм JL01, и охарактеризовать ее.



А

Б

Рис. 33. Микрофотографии клеток штамма JL01. А – фазовый контраст, величина масштабной метки 10 мкм; Б - ультратонкие срезы, величина масштабной метки 1 мкм.

Клетки штамма JL01 были неподвижны, окрашивались по Граму положительно и представляли собой нерегулярные кокки 1.0-1.5 мкм в диаметре, располагающиеся в виде агрегатов (рис. 33). Некоторые клетки имели электронно-плотные включения, вероятно,

полифосфаты. На твердых питательных средах штамм JL01 образовывал желтые зернистые колонии 1-3 мм в диаметре после 18-21 дня культивирования, а на жидких средах - небольшие, оседающие на дно агрегаты.

Была получена почти полная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма JL01 длиной 1336 п.о. Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК показал, что штамм JL01 образует единый кластер с представителями рода *Methanosarcina* с ближайшими видами *M. mazei* S-6^T (99.5% сходства) и *M. soligelidi* SMA-21^T (99.4% сходства) (рис. 34).

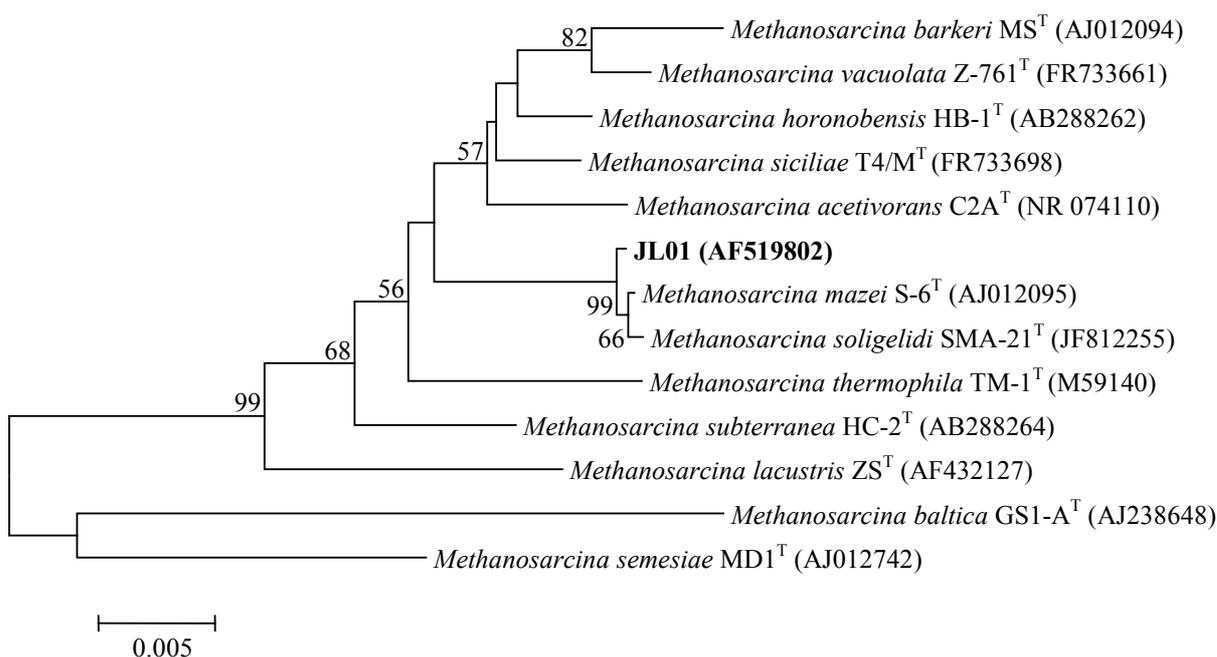


Рис. 34. Филогенетическая дендрограмма последовательностей генов 16S рРНК, показывающая положение штамма JL01 относительно типовых штаммов других видов рода *Methanosarcina*; вероятность ветвления была получена методом “neighbor-joining”. Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Штамм JL01 рос при температуре от 10 до 37°C (оптимальный рост при 24-28°C), тогда как референтный штамм S-6^T - от 20 до 50°C (оптимальный рост при 37°C) (рис. 35) и нейтрофилом, растущим в диапазоне рН от 5.5 до 8.5 (оптимум 6.8-7.3).

Штамм рос в присутствии NaCl в концентрациях от 0.01 до 0.2 М. Оптимальная концентрация NaCl в среде для роста составляла 0.075 – 0.1 М. Из всех протестированных субстратов метанол (0.038 ч⁻¹), ацетат (0.027 ч⁻¹), метиламин (0.014 ч⁻¹), диметиламин (0.013 ч⁻¹) и триметиламин (0.028 ч⁻¹) поддерживали рост и метаногенез штамма JL01. Рост не наблюдался на H₂+CO₂, H₂+метаноле, H₂+этаноле, пропионате, бутирате, формиате, лактате, дрожжевом экстракте.

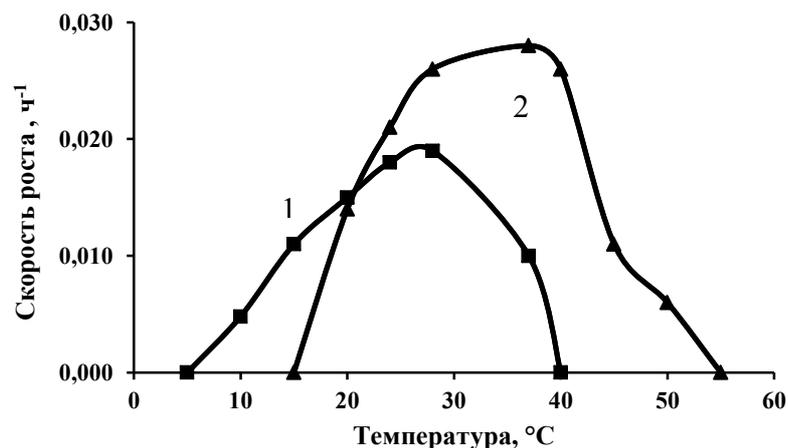


Рис. 35. Влияние температуры на рост штаммов JL01 (1) и S-6^T (2) на метаноле.

Результаты изучения влияния антибиотиков на рост штамма JL01 и референтного штамма *M. mazei* S-6^T показали, что добавление хлорамфеникола (10 мг/мл) и полимиксина (10 мг/мл) в среду культивирования подавляло рост обоих штаммов. Добавление в среду бацитрацина (10 мг/мл) замедляло рост штамма JL01. Пенициллин (2000 мг/мл), ванкомицин (2000 мг/мл), эритромицин (1000 мг/мл) и канамицин (2000 мг/мл) не влияли на рост исследованных штаммов.

Сравнение транслированной аминокислотной последовательности гена А субъединицы метил-коэнзим М редуктазы (*mcrA*) штамма JL01 с другими последовательностями этого гена типовых штаммов всех видов рода *Methanocarcina* показало, что *McrA* ген штамма JL01 на 99.4% идентичен подобному белку *M. horonobensis* НВ-1^T, в то время как идентичность с *mcrA* генами *M. mazei* и *M. solidgelidi* составила 93.1 и 96.2%, соответственно (рис. 36).

Таким образом, топология древа по транслированной последовательности *mcrA* гена абсолютно не совпадает с топологией филогенетического древа по гену 16S рРНК, что может быть подтверждением того, что ген *mcrA* менее консервативен и эволюционирует быстрее, чем ген 16S рРНК (Springer *et al.*, 1995). Подобные результаты получены и для некоторых других видов метаносарцин (Shimizu *et al.*, 2015).

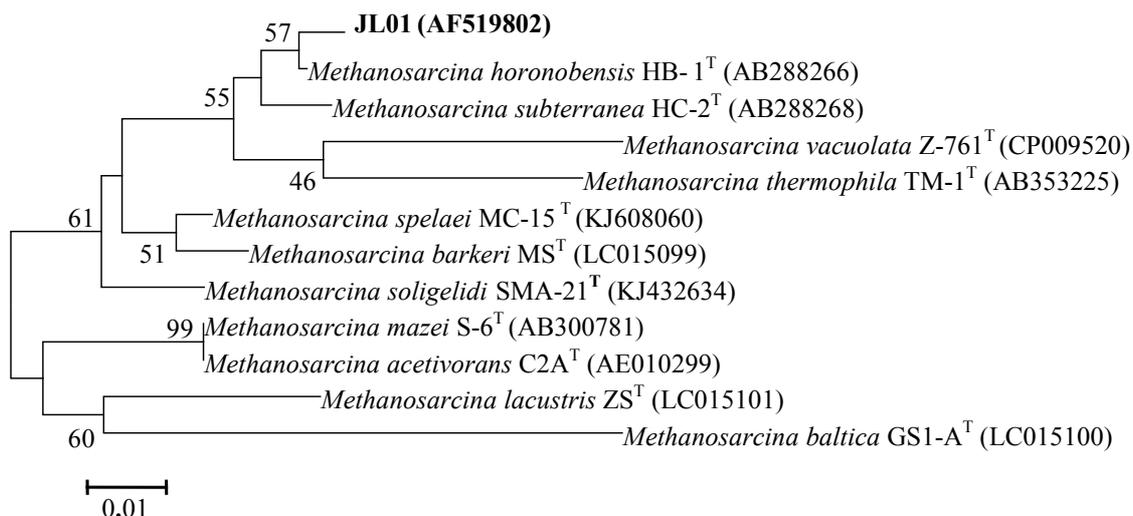


Рис. 36. Филогенетическая дендрограмма транслированных аминокислотных последовательностей *mcrA* генов (159 аа), показывающая положение штамма JL01 относительно других типовых штаммов других видов рода *Methanosarcina*; вероятность ветвления была получена методом “neighbor-joining”. Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Сравнение фенотипических характеристик штамма JL01 с типовыми штаммами близкородственных видов показало, что все они имеют сходные оптимальные параметры роста. Однако штамм JL01 отличается окрашиванием клеток по Граму, более низким значением нижней границы температурного диапазона роста и неспособностью к автотрофному росту на H_2 и CO_2 . Содержание Г + Ц пар в ДНК штамма JL01 и штамма S-6^T составило 39.2 и 42.3 мол.%, соответственно (табл. 23). А уровень ДНК-ДНК гибридизации ($26.2 \pm 2.7\%$) показал, что штаммы принадлежат разным видам.

Однако сравнение целых геномных последовательностей (ANI) изолята и типового штамма *M. mazei* оказался 98.5%, что выше значений, рекомендованных для новых видов (95-96%). Таким образом, штамм JL01 является первым штаммом *M. mazei*, выделенным из отрицательно-температурных грунтов вечной мерзлоты.

Таблица 25. Сравнительная характеристика штамма JL01 и близкородственных видов метаносарцин

Признаки	JL01	<i>M. mazei</i> DSM 2053 ^T	<i>M. soligelidi</i> SMA-21 ^T
Морфология	Псевдосарцины	Псевдосарцины, кокки	Кокки
Диаметр, мкм	1.0-1.5	1.0-3.0	1.3-2.5
Окраска по Граму	+	-	-
Температура, °С Диапазон (оптимум)	10-37 (24-28)	20-50 (30-40)	0-54 (28)
pH Диапазон (оптимум)	5.5-8.5 (6.8-7.3)	5.5-8.5 (6.0-7.0)	4.8-9.9 (7.8)
NaCl, М Диапазон (оптимум)	0.01-0.2 (0.075-0.1)	0.1–1.0 (0.1-0.3)*	0.02-0.6 (0.02)
Г+Ц, мол. %	39.2	42.0	40.9
Субстраты	Метанол, ацетат, метиламины	Метанол, ацетат, метиламины, H ₂ /CO ₂	Метанол, ацетат, H ₂ /CO ₂
Источник выделения	Вечная мерзлота, Арктика, Россия	Биореактор, США	Мерзлые почвы, Арктика, Россия

6.6.2 Водородиспользующие метаногены из вечной мерзлоты

Штамм M2^T был выделен с глубины 2.0 м тех же голоценовых отложений Колымской низменности, что и штамм JL01. Клетки штамма M2^T были неподвижными слегка изогнутыми палочками диаметром 0.45-0.50 мкм и длиной 3.0-6.0 мкм (рис. 37, а), часто образующими нити длиной более 30 мкм. В стационарной фазе роста или при длительном хранении в культуре клеток обнаруживались цистоподобные коккоидные клетки (рис. 37, б.), которые отличалась цитоплазмой высокой плотности и образованием, дифференцированные (различающиеся по электронной плотности и толщине) поверхностные покрытия. Толщина клеточной стенки увеличивалась с 10-11 нм в вегетативных клетках до 50 нм в цистоподобных клетках. Чистоту культуры штамма M2^T оценивали по профилю рестрикции хромосомной ДНК. Раннее образование клеток, цистоподобных форм, было обнаружено в подобных условиях у галоархей (El-Registan *et al.*, 2006; Suzina *et al.*, 2006). Клетки делились штамма M2^T путем образования перегородки, и окрашивались по Граму отрицательно.

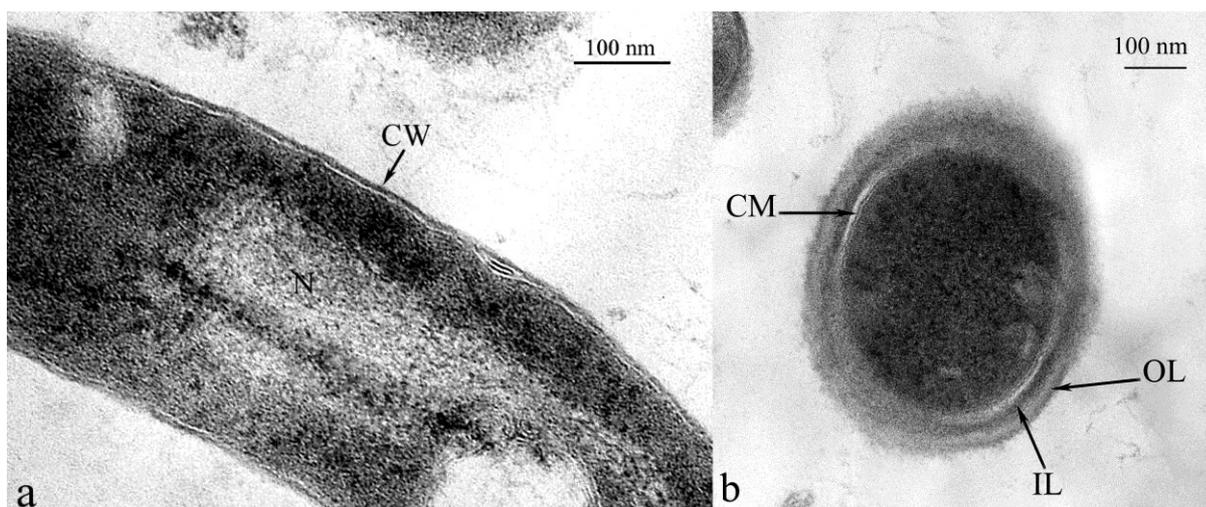


Рис. 37. Ультратонкие срезы клетки штамма M2^T (а) и цистоподобной клетки (b). CW - клеточная стенка; IL, OL - внутренний и наружный слой клеточной стенки соответственно; CM - клеточная мембрана.

Клетки водородиспользующих штаммов из более древних грунтов представляли собой палочки с уплощенными (МК3) и заостренными концами (МК4). Размер клеток штамма МК3 варьировал от 0.5 до 0.6 мкм в ширину и от 6.0 до 8.0 мкм в длину. Клетки штамма МК4 были более мелкими – 0.3-0.4 на 4.0-6.0 мкм. На ультратонких срезах заметны следы капсулы, которая часто образовывалась вокруг клетки (рис. 38). По Граму штаммы МК3 и МК4 окрашивались отрицательно, однако исследования ультратонких срезов показали наличие клеточной стенки грамположительного типа. В старой культуре клетки образовывали агрегаты и нити.

Из ДНК изолятов и секвенирования были получены большие фрагменты генов 16S рРНК 1434 п.о. (M2^T) и 1347 п.о. (МК4^T). Филогенетический анализ полученных последовательностей (рис. 39) показал, что оба штамма относятся к семейству *Methanobacteriaceae* из порядка *Methanobacteriales*, а ближайшим родственником для них был *Methanobacterium bryantii* со сходством 99.3 и 99.4%, соответственно.

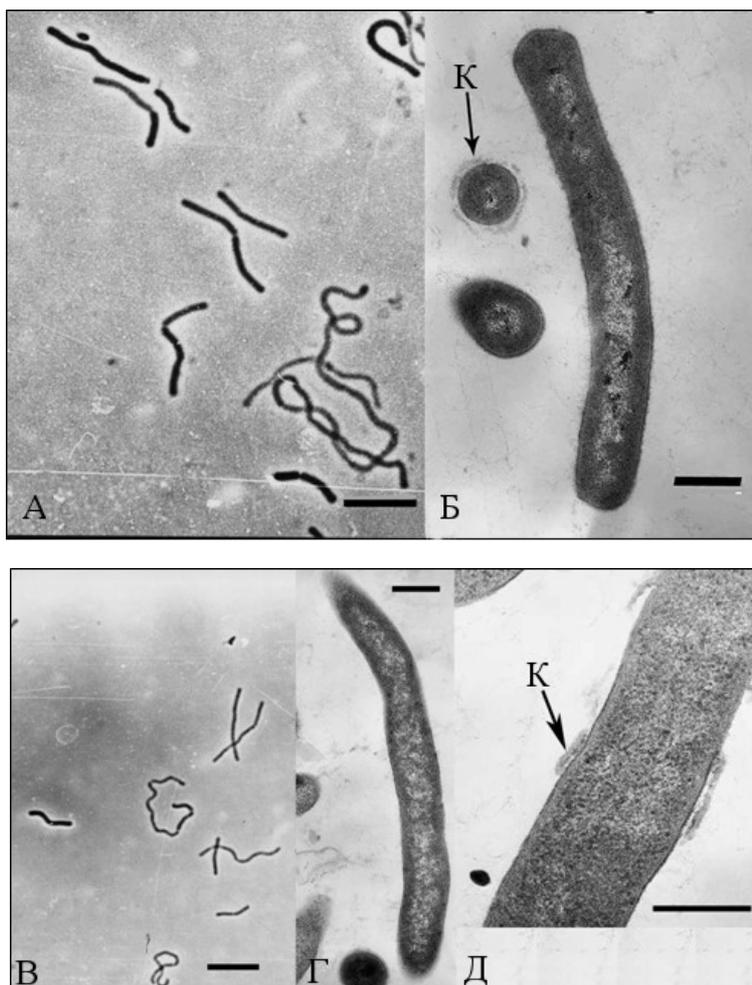


Рис. 38. Микрофотографии клеток штаммов МК-3 и МК-4: А, В - фазовый контраст, величина масштабной метки 10 мкм; Б, Г, Д – ультратонкие срезы, величина масштабной метки 0.5 (Б, Г) и 0.2 мкм (Д) мкм; К – капсула.

Исследование оптимальных параметров роста показало, что рост штамма М2^T наблюдался при температурах между 15 и 46°C (оптимальный 37°C), а штамма М.о.Н.^T - и при температурах между 20 и 50°C (оптимально 37°C), штамм МК4^T рос в диапазоне температур 10-46°C с оптимумом при 28°C (рис. 40). По классификации Morita (1975) все изученные штаммы были мезофилами, однако, по мнению других исследователей, они могут быть отнесены к психрофилам, учитывая их место обитания (Cavichioli, 2016). Следует отметить, что для штамма МК4^T был характерен более широкий диапазон температурного роста.

Влияние pH на рост измеряли в основной среде для каждого штамма с добавлением стерильной HCl или карбонатов для получения требуемого конечного pH. В конце экспоненциальной фазы наблюдалось уменьшение pH среды не более 0.2-0.4. Штамм М2^T рос в диапазоне pH от 5.5 до 8.5 с оптимальным значением 6.8-7.2. Штамм МК4^T рос при pH 5.2-9.4 (оптимум pH 7.0-7.2). Оптимальный рост штамма М.о.Н.^T наблюдался при 6.9-7.0 в диапазоне pH от 5.8 до 8.8. Следовательно, все штаммы были нейтрофилами.

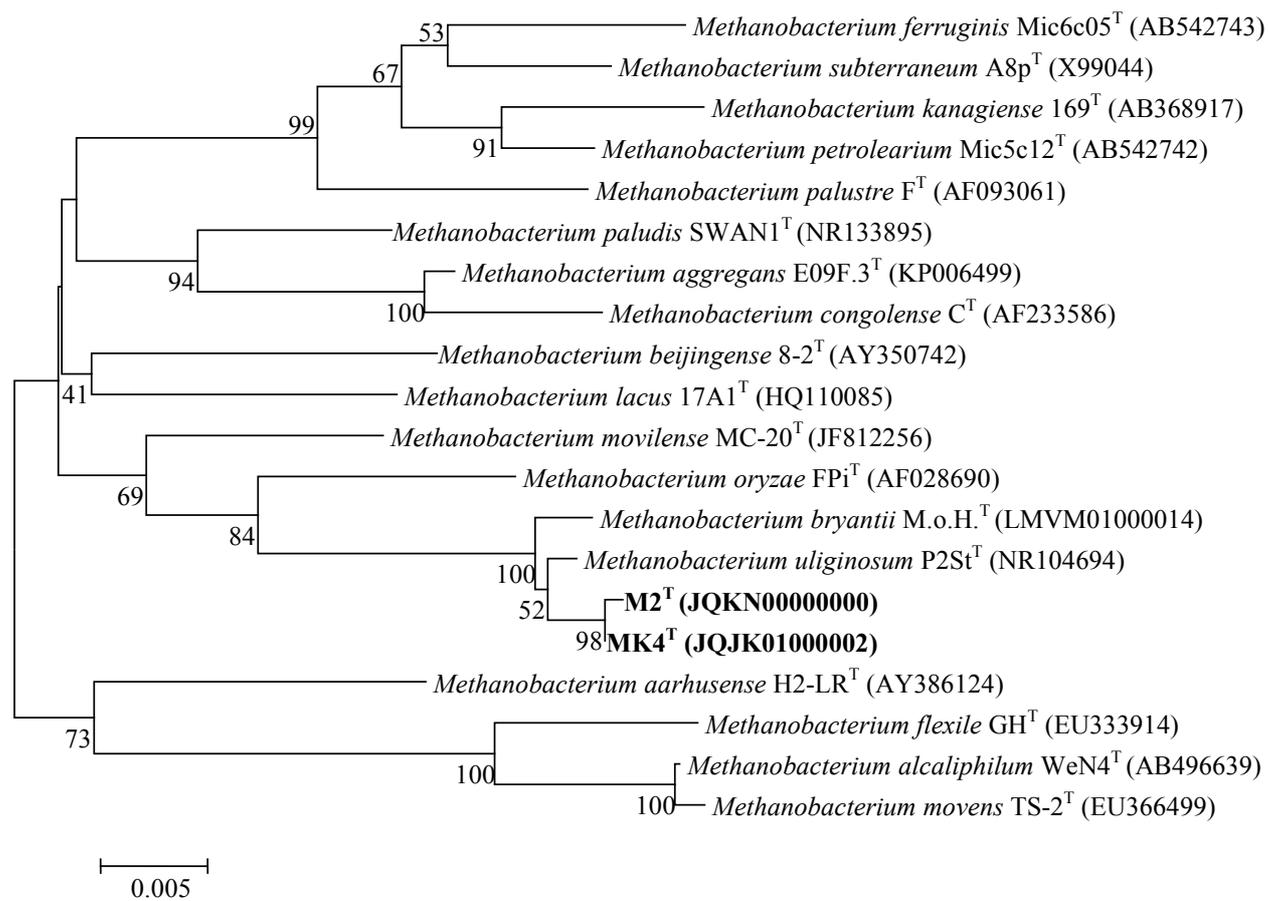


Рис. 39. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК представителей рода *Methanobacterium*. Археи, выделенные из арктических экосистем, показаны жирным шрифтом. Длина масштабной линейки: 5 замен на 1000 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках. Дендрограмма построена с использованием метода “*neighbour-joining*”. Данные “bootstrap”-анализа указаны в точках ветвления.

Все исследованные штаммы метаногенов не требовали хлорида натрия в среде культивирования: штамм M2^T рос при концентрациях NaCl от 0 до 0.3 М, с оптимальным при 0.1 М NaCl; штамм MK4^T рос при 0–0.3 М (оптимум 0.05 М) NaCl; концентрации NaCl до 0.3 М не влияли на рост *M. bryantii*.

В качестве источника роста и метаногенеза были испытаны следующие субстраты: H₂+CO₂, метанол (20 мМ), формиат (50 мМ), ацетат (50 мМ), этанол (20 мМ), 2-пропанол (20 мМ), 2-бутанол (20 мМ) метанол (50 мМ) + H₂, метиламин (20 мМ) + H₂, метиламин (20 мМ), триметиламин (20 мМ). H₂ + CO₂ (0,026 ч⁻¹) и формиат (0.014 ч⁻¹) поддерживали рост и метаногенез штамма M2^T. На H₂+CO₂ штамм MK4^T рос с удельной скоростью 0.026 ч⁻¹, на метаноле и H₂ со скоростью 0.014 ч⁻¹ и на метиламине+H₂ со скоростью 0.012 ч⁻¹, тогда как штамм M.o.H.^T рос на H₂+CO₂ со скоростью 0.031-0.036 ч⁻¹) и использовал 2-пропанол и 2-бутанол для образования

метана без видимого роста. Проверка добавления ацетата (1, 2, 5, 10 и 20 мМ), дрожжевого экстракта (0.1 и 0.5 г/л), коэнзима М (25 мг/л), казаминовых кислот (1 г/л) в качестве факторов роста показала увеличение скорости роста штамма МК4^T только при добавлении ацетата в концентрации 5 и 10 мМ. На рост штамма М2^T органические добавки не оказывали стимулирующего влияния.

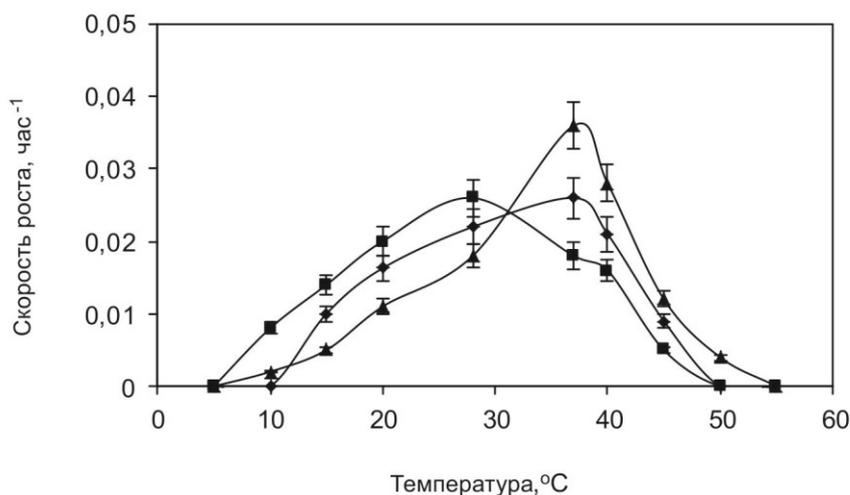


Рис. 40. Влияние температуры на рост штаммов М2^T (◆), МК4^T (■) и М.о.Н.^T (▲).

Влияние антибиотиков определяли путем сравнения роста культур, содержащих антибиотики, с контролем, который их не содержал. Рост М2^T, МК4^T и М.о.Н.^T подавлялся добавлением хлорамфеникола и полимиксина. Добавление пенициллина и бацитрацина замедляло рост штамма М2^T. Добавление пенициллина не влияло на рост МК4^T и М.о.Н.^T, но добавление бацитрацина полностью подавляло рост штаммов МК4^T и М.о.Н.^T. Как известно, бацитрацин ингибирует образование предшественников муреина в бактериях (Whitman *et al.*, 1992), вероятно, он может оказывать такое же влияние на метаногены семейства *Methanobacteriaceae*, клеточные стенки которых состоят из псевдомуреина. Ванкомицин, эритромицин и канамицин не влияли на рост изученных штаммов.

Клетки штаммов М2^T и МК4^T из экспоненциальной фазы роста были устойчивы к лизису при добавлении 1% SDS в дистиллированной воде в качестве гипотонического раствора.

Содержание Г+Ц в ДНК исследуемых штаммов составляло 38.1 ± 0.3 (М2^T), 33.8 ± 0.3 (МК4^T) и 35.2 ± 0.5 (М.о.Н.^T) мол.%. Все значения были в пределах, определенных для *Methanobacterium* spp. Определение уровня ДНК-ДНК реассоциации показало сходство

37±6 и 62±3% между штаммами M2^T, МК4^T и *M.bryantii* М.о.Н.^T и 40±6% между штаммами M2^T и МК4^T.

Таблица 26. Дифференцирующие свойства штаммов M2^T, МК4^T и *Methanobacterium bryantii* М.о.Н. Все штаммы росли на H₂+CO₂.

Свойства	Штамм M2 ^T	Штамм МК4 ^T	<i>M. bryantii</i> штамм М.о.Н. ^T
Размер палочек, мкм	0.45-0.5x3.0-6.0	0.40-0.45x2.0-8.0	0.5-0.6x10-15
Субстраты для роста	формиат	метиламин+H ₂ метанол+H ₂	2-пропанол 2-бутанол
Стимулирующие факторы	нет	ацетат	дрожжевой экстракт, ацетат
Температура Диапазон оптимум, °С	15-46 37	10-50 28	20-50 37
рН диапазон оптимум	5.5-8.5 6.8-7.2	5.2-9.4 7.0-7.2	5.8-8.8 6.9-7.0
Соленость диапазон (оптимум), М	0-1.6 0.1	0 – 0.3 0.03	0-0.35 0-0.35
Г+Ц, мол. %	38.1	33.8	35.2

На основании сравнения последовательностей генов 16S рРНК и других характеристик неподвижные, палочковидные, метаногенные виды, которые могут использовать H₂+CO₂ в качестве источника роста и энергии, штаммы M2^T и МК4^T должны быть отнесены к роду *Methanobacterium* (Boone and Whitman, 1988), Штамм M2^T отличается от *M. bryantii* и МК4^T способностью использовать формиат как единственный источник углерода и энергии.

Сравнение группы генов (табл. 27), отвечающих за метаногенез показало, что все три штамма имеют одинаковый набор ферментов, а отличаются только количеством копий генов 5,10-метилентетрагидрометанооптерин редуктазы (1.5.99.11), пируват – водной дикиназы (2.7.9.2) и коэнзим – В – сульфэтилтиотрансферазы (2.8.4.1). В то же время, геном *M. bryantii* отличается от геномов мерзлотных метаногенов наличием только одного гена 16S рРНК и значительно большим количеством псевдогенов.

Таблица 27. Характеристика геномов выделенных водородиспользующих штаммов.

Характеристика	<i>Methanobacterium veterum</i> МК4 ^Т	<i>Methanobacterium arcticum</i> М2 ^Т	<i>Methanobacterium bryantii</i> М.о.Н. ^Т
Размер генома, млн н.о.	3.37	3.39	3.47
Число хромосом	1	1	1
плазмиды	0	0	0
G+C, %	33.2	33.2	33.2
Идентифицированные ОРС	3334	3358	3526
Кол-во псевдогенов	20	18	67
рРНК	6	6	1
тРНК	40	40	40
Гипотетические белки	1958	1977	3204
Функциональные белки	1758	1773	2243
Гены метаболизма метана	88	87	87

Определение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* показало, что сходство между *M. bryantii* М.о.Н.^Т, *M. veterum* МК4^Т и *M. arcticum* М2^Т находится в пределах от 26.6 до 48.5%, что ниже значений уровня реассоциации ДНК, определенное по температуре плавления и составляющее от 37.0 до 62.0% (Shcherbakova et al., 2011) и подтверждает их принадлежность к разным видам рода *Methanobacterium*.

Таблица 28. Сравнение сходства геномов водородпотребляющих штаммов, выделенных из мерзлоты, и типового штамма близкородственного вида *M. bryantii* М.о.Н.^Т

DDH\ANI	<i>M. bryantii</i> М.о.Н. ^Т	МК4 ^Т	М2 ^Т
<i>M. bryantii</i> М.о.Н. ^Т	100	92.3	77.5
МК4 ^Т	48.5	100	80.1
М2 ^Т	26.6	31.3	100

Принимая во внимание фенотипические различия (табл. 26), низкие значения гибридизации ДНК-ДНК с ближайшими родственниками в том числе, определенные *in silico*, а так же значения сравнения полных геномов (табл. 28) мы предложили выделить штаммы М2^Т и МК4^Т в новые виды рода *Methanobacterium*, *Methanobacterium arcticum* и *Methanobacterium veterum*.

Предложения новых видов водородиспользующих архей

***Methanobacterium arcticum* sp.nov.** [arc.ti'cum. L. neut. adj. arcticum, северный, арктический, из Арктики, выделенный из арктической вечной мерзлоты]

Представитель филума *Euryarchaeota* домена *Archaea*. Грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие, строго анаэробные, хемоавтотрофные, слегка изогнутые палочки. Размер клеток 0.45-0.50 мкм в ширину и 3.0-6.0 мкм в длину. Часто образует нити и цистовидные кокковидные клетки. Оптимальный рост наблюдается при 37°C, максимальная температура роста – 42 °С. Оптимальный pH составляет 7.0-7.2. Никакого роста не происходит при pH 5.5 или 9.0. Использует H₂+CO₂ и формиат для роста и образования метана. Не растет на ацетате, метаноле, 2-бутаноле, метиламинах, этаноле, 2-пропаноле, 2-бутаноле, метаноле+H₂, метиламине+H₂. Рост не стимулируется ацетатом и другими органическими добавками.

Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма M2^T (=VKM B-2371^T = DSM 19844^T), выделенного из голоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, Россия (70°06'N, 154° 04'E) составляет 38.1 мол.%. Последовательность гена 16S рРНК типового штамма депонирована в GenBank под номером DQ517520.

Methanobacterium veterum (ve'te.rum. L. gen. pl. n. древний, старый).

Грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие, анаэробные, хемоавтотрофные палочки. Клетки слегка изогнутые, 2.0–8.0 мкм в длину и 0.40–0.45 мкм в ширину. Встречаются одиночно, но могут образовывать цепочки (до 30 мкм) и агрегаты. Флюоресцируют под ультрафиолетом (420 нм). Делятся путем образования септы. Используют H₂/CO₂, метанол+H₂ и метиламин+H₂ в качестве источника для роста и метаногенеза. Не растут на формиате, ацетате, этаноле, изопропаноле, изобутаноле, метиламине или триметиламине. Добавление ацетата стимулирует рост. Оптимальные условия роста: 28 °С, pH 7.0–7.2 и 0.05 M NaCl.

Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма МК4^T (=VKM B-2440^T =DSM 19849^T), выделенного из древних (3 млн. лет) многолетнемерзлых отложений Арктики (Колымская низменность, 70°06' с.ш. 154°04' в.д.) составляет 33.8 мол.%. Последовательность гена 16S рРНК типового штамма депонирована в GenBank под номером EF016285.

Выделение в чистую культуру штаммов метаногенных архей, представляющих два новых вида *Methanobacterium* (*M. veterum* и *M. arcticum*), и штамма JL01, отнесенного нами к виду *Methanosarcina mazei* стало новым аргументом в пользу биогенного происхождения метана и сохранения жизнеспособности метаногенных архей в вечной

мерзлоте. Бактериальный спутник метаносарцины был также описан как новый вид сферических спирохет *S. associata* GLS2^T. Бактерия обладает свойством образовывать наноразмерные формы клеток, вероятно, сохраняющиеся в полисахаридном каркасе метаносарцины при неблагоприятных условиях. Возможно, подобные бактериальные клетки наблюдала Т.Н. Жилина в психрофильной метаносарцине, выделенной ею из подмосковного болота (Жилина, 1979).

Таблица 29. Общая характеристика геномов прокариот, выделенных из вечной мерзлоты.

Характеристика	<i>S. associata</i> GLS2 ^T	<i>M. arcticum</i> M2 ^T	<i>M. veterum</i> MK4 ^T	' <i>D. gilichinskyi</i> ' K3S ^T
Общее количество оснований ДНК, млн	3.55	3.39	3.37	3.96
ГЦ содержание, %	50.6	33.2	33.2	42.0
Общее число генов	3310	3349	3319	3648
Гены РНК	59	48	48	72
рРНК (16S)	8 (3)	6 (2)	6 (2)	7 (1)
тРНК	48	40	40	60
Гены белков с предсказанной функцией	2604	2253	2253	2768
Гены, кодирующие ферменты	856	692	694	883
Гены белков в КОГ (COG)	2286	1906	1907	2279
Гены, полученные в результате горизонтального переноса	344	392	11	123

Нами получены геномные последовательности всех выделенных метаногенов, *S. associata* GLS2^T, а также СБВ '*D. gilichinskyi*' K3S^T (табл. 29), сравнение которых с геномами близкородственных видов подтвердило установленный таксономический статус всех изолятов. Анализ генома *S. associata* GLS2^T показал, что эта бактерия нуждается в ряде аминокислот, обладает набором генов для утилизации метанхондроитина – компонента клеточной стенки метаносарцин, а также генами для транспорта осмопротектора глицин бетаина, который может производить *Methanosarcina mazei* JL01. Дальнейший анализ геномов позволит определить другие причины и возможности тесной кооперации бактерии и археи. Но уже сейчас очевидно, что от возраста ММО, из которых выделен прокариотный организм, зависит количество генов, полученных в результате горизонтального переноса (табл. 29). Как следует из выше изложенного, разнообразие культивируемых анаэробных и факультативно-анаэробных прокариот мерзлых пород и криопэгов представлено бактериями и археями, которые по предложению Риккардо Кавичолли (Cavichioli, 2016) можно отнести к психрофильным в виду того, что все они выделены из мест обитания с постоянными отрицательными температурами.

Таблица 30. Психрофильные и психроактивные анаэробные и факультативно-анаэробные прокариоты, выделенные из мерзлых отложений и криопэггов.

Организм	Температурный диапазон (оптимум), °С	Субстраты/продукты	Местообитание
<i>Clostridium tagluense</i> 121A ^T	(0 – 28) 15	Пептон, дрожжевой экстракта, fumarat, малат, триптиказа, бетаин, холин, D-глюкоза, мальтоза, фруктоза, трегалоза / бутират, ацетат, валерат, этанол, H ₂ и CO ₂	Вечная мерзлота, Канада
<i>Clostridium algoriphilum</i> 14D1 ^T	(-5 – 18) 5-6	D-глюкоза, моно- и дисахариды, <i>mio</i> -инозитол, сорбит, маннит, целлобиоза, пептон, дрожжевой экстракт, fumarat, малат, триптиказа, трегалоза, ксилан, бетаин, холин /бутират, формиат, лактат, ацетат, этанол, H ₂ и CO ₂	Криопэг, Колымская низменность, Россия
' <i>Clostridium frigoriphilum</i> ' 14F ^T	-5 – 18 (5-6)	D-глюкоза, моно- и дисахариды, целлобиоза, <i>mio</i> -инозитол, маннитол, салицин, трегалоза, fumarat, малат, ксилан, крахмал/ бутират, лактат, H ₂ и CO ₂	Криопэг, Колымская низменность, Россия
' <i>Psychrobacter muriicola</i> ' 2pS ^T	-2 – 37 (16-18)	Дрожжевой экстракт, пируват, глутарат, fumarat, капроат, гептаноат, бутират, L-малат, DL-лактат, цитрат, L-пролин, L-тирозин, метанол, бутанол, дульцит / CO ₂	Криопэг, Колымская низменность, Россия
' <i>Desulfovibrio gilichinskyi</i> ' K3S ^T	-2 - 36 (26)	DL-лактат, формиат, водород, этанол, fumarat, L-аланин и пируват / ацетат, CO ₂	Криопэг, Ямал, Россия
<i>Desulfovibrio arcticus</i> B15 ^T	-2 – 28 (24)	H ₂ + ацетат, формиат, DL-лактат, пируват, этанол / ацетат, CO ₂	Криопэг, Варандей, Россия
<i>Celerinatantimonas yamalensis</i> C7 ^T	0-34 (18-22)	D-глюкоза, моно- и дисахариды, целлобиоза, ксилан, дульцит, сорбит, глицерин, сукцинат, fumarat, L-малат, пируват, цитрат, D-глюконат, N-ацетилглюкозамин / ацетат, этанол, CO ₂	Криопэг, Ямал, Россия
<i>Sphaerochaeta associata</i> GLS2 ^T	20-40 (30-34)	D-глюкоза, моно- и дисахариды, целлобиоза, крахмал, лактат, глюкуроновая кислота /ацетат, CO ₂	Вечная мерзлота, Россия
<i>Methanosarcina mazei</i> JL01	10-37 (24-28)	Ацетат, метанол, метиламины / CH ₄	Вечная мерзлота, Россия
<i>Methanobacterium arcticum</i> M2 ^T	15-46 (37)	H ₂ +CO ₂ , формиат / CH ₄	Вечная мерзлота, Россия
<i>Methanobacterium veterum</i> MK4 ^T	(10-50) 24-28	H ₂ +CO ₂ , метанол+H ₂ , метиламин+H ₂ / CH ₄	Вечная мерзлота, Россия

В криопэгах бактерии были представлены *Firmicutes* и *Proteobacteria* дельта- и гамма классов, а из мерзлых грунтов были выделены представители *Firmicutes* и филума

Spirochaetes. Археи, представленные метаногенами филума *Euryarchaeota*, были выделены только из мерзлого грунта.

Полученные нами характеристики изолятов (табл. 30) показывают, что арктические бактерии и археи могут быть звеньями одной трофической цепи. Так *C. tagluense* и *S. associata* могут поставлять ацетат, CO₂ и H₂ для водородпотребляющих и ацетокластических метаногенов в вечномерзлых грунтах, как в случае их таяния, так и, возможно, в естественных условиях при постоянной отрицательной температуре. В криопэгах *C. algoriphilum*, '*C. frigoriphilum*' и *C. yamalonensis*, утилизируя сахара, крахмал и ксилан из растительных остатков могут поставлять субстраты для *Psychrobacter* spp. и *Desulfovibrio* spp. Кроме бактерий, целлюлозолитические микромицеты *Geomyces pannorum*, выделенные нашими коллегами из колымских криопэгов (Gilichinsky *et al.*, 2005), в анаэробных условиях могут продуцировать не только сахара, но и лактат (Щербакова *и др.*, 2010), который является субстратом почти для всех СВБ. Как показали наши исследования, *C. yamalonensis* может фиксировать азот, образующийся в процессе восстановления нитритов и нитратов, однако ни один из выделенных микроорганизмов не был способен восстанавливать соединения азота. Полученные данные о биосинтезе изопреноидов ряда анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий и архей показали, что психрофильные клостридии используют меволонатный путь биосинтеза этих важных компонентов клеточной стенки, в отличие от мезофильных и термофильных представителей этого филума (Трутко С.М. *и др.*, 2005).

Дальнейшее изучение микробного разнообразия этих уникальных экосистем позволит заполнить функциональные пробелы в трофических цепях анаэробной части циклов углерода, серы и азота.

ГЛАВА 7. АДАПТАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ К ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

7.1 Особенности роста выделенных бактерий при отрицательных температурах

Почти все выделенные из криопэгов и многолетнемерзлых осадков бактерии были способны к росту при температурах ниже нуля: *C. algorithilum* 14D1^T, '*C. frigoriphilum*' 14F^T, *D. arcticus* B15^T, '*D. gilichinskyi*' K3S^T, *Psychrobacter* spp. 1pS, 2pS^T, 3ps росли со временем удвоения от 2 до 18 дней.

7.1.1 Основные параметры роста выделенных из криопэга бактерий рода *Clostridium* при различных температурах

Штаммы 14D1^T и 14F^T имели сравнимые времена удвоения при оптимальной и исследованных отрицательных температурах (табл. 31). Отношение образованной биомассы к количеству потребленного субстрата является важным показателем роста. Некоторые авторы (Targgaard et al., 2005) даже предлагают при оценке адаптации к температуре учитывать экономический коэффициент, а не удельную скорость роста. Для выделенных клостридий этот показатель существенно не менялся при оптимальной и отрицательных температурах культивирования, а для 14D1 даже возрастал при -2°C, что согласуется с литературными данными относительно психротолерантных СББ (Knoblauch and Jorgensen, 1999; Targgaard et al., 2005). Особенностью роста обоих штаммов было также то, что к началу стационара они достигали большей оптической плотности при отрицательных температурах культивирования, чем при оптимальных (табл. 27).

Таблица 31. Параметры роста штаммов 14D1^T и 14F^T при периодическом культивировании.

показатель	<i>C. algorithilum</i>			<i>C. frigoriphilum</i>		
	5°C	-2°C	-5°C	5°C	-2°C	-5°C
Время удвоения, ч	21	125.6	147	28.5	131.1	151.5
OD _{макс}	0.65	0.86	0.86	0.47	0.68	0.61
Экономический коэффициент, %	37	43	35	19	18	16
Длительность лаг-фазы, ч	48	162	192	72	240	360

7.1.2 Образование продуктов метаболизма анаэробной бактерией *C. algorithilum* при различных температурах культивирования.

Штамм 14D1 *C. algorithilum* принадлежит к сахаролитическим клостридиям и ферментирует ряд сахаров с образованием жирных кислот, лактата и небольших

количеств этанола. Исследование динамики накопления продуктов брожения *C. algorithum* при оптимальной и отрицательной температурах культивирования (рис. 41) показало, что для роста при оптимальной температуре характерно накопление бутирата и лактата в соотношении примерно 1:1, а также небольших количеств гептаноата, изобутирата, ацетата и капроата. Рост при -2°C сопровождался образованием бутирата и лактата в соотношении 3:1 и небольших количеств этанола.

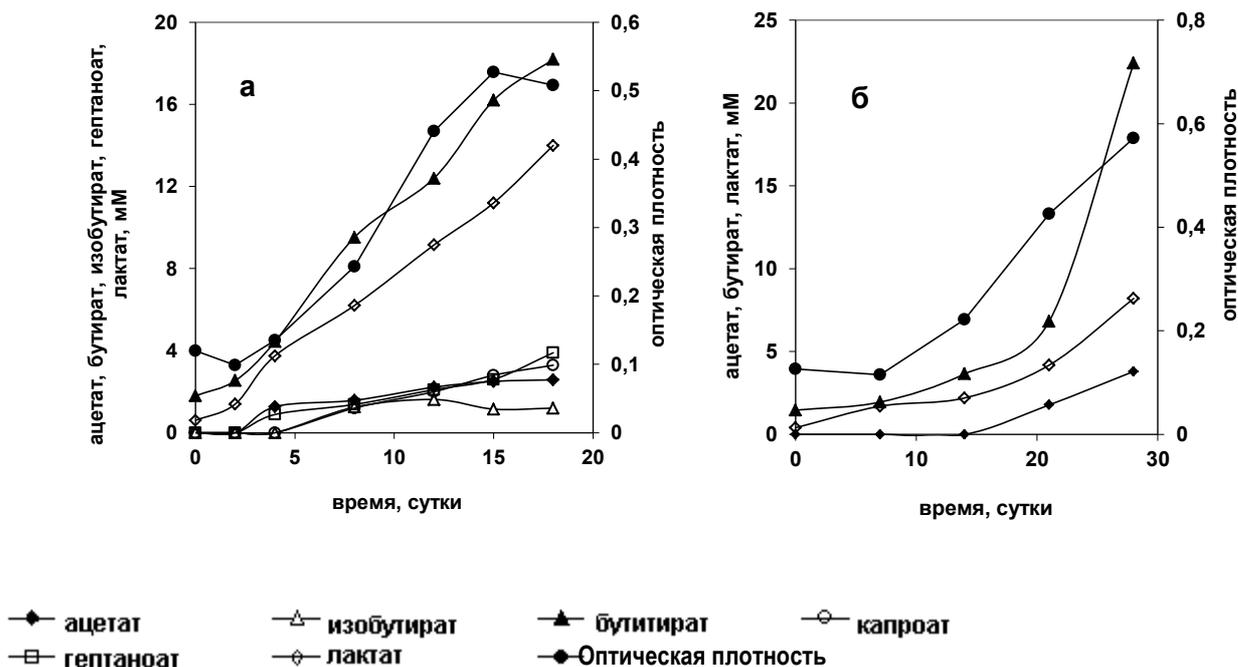


Рис. 41. Рост и образование продуктов метаболизма *C. algorithum* штамм 14D1 при различных температурах: (а) 5°C , (б) -2°C .

7.1.3 Исследование влияния температуры и солености на скорость роста *C. aloriphilum* и '*P. muriicola*'.

Одновременное влияние температуры и солености на скорость роста изучали на примере *C. aloriphilum* штамм 14D1^T и '*P. muriicola*' штамм 2pS^T.

Как показали результаты наших исследований, представленные на рис. 42, а, при 5°C для *C. aloriphilum* оптимальным было содержание соли 0.1-0.5 %, а при 4.5 % рост прекращался. Другая картина была характерна для роста при отрицательной температуре (-5°C). В этом случае рост продолжался даже при солености 10.0 %, а максимальной скорости роста культура достигала при концентрации 1.0% NaCl в среде.

Как при оптимальной (18°C), так и при отрицательной (-2°C) температурах культивирования, оптимум солености '*P. muriicola*' штамм 2pS^T составлял 1.0 % (рис. 42, б.). При 18°C и солености 10.0 % рост не наблюдался, в то время как при отрицательной температуре и такая концентрация соли не ингибировала рост.

Таким образом, для роста выделенных культур при отрицательной температуре было характерно расширение пределов толерантности по отношению к солености среды.

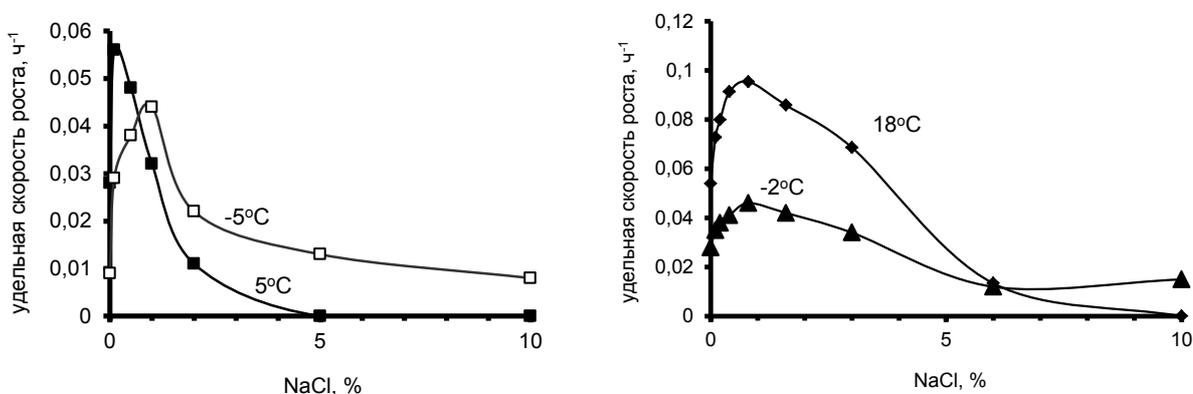


Рис. 41. Влияние температуры культивирования и солености среды на удельную скорость роста *C. aloriphilum* 14D1^T (а) и '*P. muriicola*' 2pS^T (б).

7.1.4 Влияние температуры культивирования на спектр утилизируемых субстратов *C. aloriphilum* и '*P. muriicola*'.

Проверка способности новых изолятов утилизировать органические соединения при трех температурах, в том числе отличающихся от оптимальных для каждого вида, показала, что способность утилизировать то или иное соединение в качестве единственного источника углерода и энергии зависит от температуры культивирования. Так, штамм 14D1^T не был способен расти на ксилане и целлобиозе при 18°C, но рос на

этих соединениях при 5 и -2°C, не использовал глутамат при 5 и 18°C, но рос на этом субстрате при -2°C. Штаммы 1pS и 2pS^T не использовали в качестве субстратов, сахарозу, трегалозу, L-глутамат и L-аланин в оптимальных для роста температурных условиях (18°C), но росли на этих соединениях при пониженных температурах (табл. 32.).

Таблица 32. Использование некоторых органических соединений в качестве источников углерода и энергии новыми бактериями при 18, 5 и -2°C.

Субстраты	Температура, °C	<i>C. algorithilum</i> 14D1	<i>P. muriicola</i> 1 pS	<i>P. muriicola</i> 2 pS
ксилан	18	-	-	-
	5	+	-	-
	-2	+	-	-
целлобиоза	18	-	-	-
	5	+	-	-
	-2	+	-	-
D-глюкоза	18	+	-	-
	5	+	+	+
	-2	+	н.о.	+
сахароза	18	+	-	-
	5	+	-	+
	-2	+	н.о.	+
трегалоза	18	+	-	-
	5	+	+	+
	-2	+	н.о.	+
L-глутамат	18	-	-	-
	5	-	+	+
	-2	+	н.о.	+
L-аланин	18	-	-	-
	5	-	+	+
	-2	-	н.о.	+

Как показали наши исследования, приближение температуры культивирования к температуре среды обитания расширяло спектр используемых субстратов. Подобные результаты были получены Ругером (Ruger, 1988) для глубоководных бактерий родов *Alteromonas*, *Bacillus* и *Vibrio*. Другими авторами (Ponder *et al.*, 2005) для бактерий из вечной мерзлоты *Psychrobacter* sp. 273-4 и *Exiguobacterium* sp. 255-15 также были показаны зависимые от температуры различия в спектре потребляемых субстратов. Так, *Psychrobacter* sp.273-4 утилизировал 32 различных источника углерода при 24 и 4°C, шесть из которых использовались исключительно при 4°C, а двенадцать - только при 24°C. Штамм *Exiguobacterium* sp. 255-15 был способен утилизировать 42 источника углерода при 24°C и только 36 при 4°C. Семь соединений использовались исключительно при 4°C и тринадцать - только при 24°C.

7.2 Состав жирных кислот клеток при различных условиях культивирования

Изменения жирнокислотного состава липидных комплексов клеток изучали на примере *C. algorithilum* 14D1 и '*P. turiicola*' штамм 2pS^T. Для анализа брали клетки из поздней логарифмической фазы роста.

Таблица 32. Влияние температуры культивирования на состав жирных кислот мембран *C. algorithilum*.

Жирная кислота		+5°C	-2°C
додекановая	12:0	0.53	0.82
тридекановая	13:0	0.16	-
омега7-тетрадеценовая	14:1ω7	0.99	0.83
омега5-тетрадеценовая	14:1ω5	0.67	0.48
тетрадекановая	14:0	30.52	26.25
омега7-тетрадеценовый альдегид	14:1ω7a		0.29
омега5-тетрадеценовый альдегид	14:1ω5a	1.69	0.25
тетрадекановый альдегид	14:0 a	0.40	0.21
омега9-пентадеценовая	15:1ω9	2.97	2.10
пентадекановая	15:0	0.24	
пентадеценовый альдегид	15:1a	0.23	0.34
омега9-гексадеценовая	16:1ω9	1.90	1.48
омега7-цис-гексадеценовая	16:1ω7c	25.61	35.34
омега5-цис-гексадеценовая	16:1ω5	4.46	4.20
гексадекановая	16:0	5.09	2.39
гидрокси-изо-пентадекановая	3hi15	0.62	0.25
омега7-гексадеценовый альдегид	16:1ω7 a	21.62	22.47
омега5-гексадеценовый альдегид	16:1ω5 a	0.17	-
изо-гептадеценовая	i17:1	0.34	-
цикло-гептадекановая	17cyclo	0.37	0.98
гептадеценовый альдегид	17:1a	-	0.20
омега9-октадеценовая	18:1ω9	0.51	0.54
омега7-октадеценовая	18:1ω7	0.26	0.28
октадекановая	18:0	0.65	0.31

7.2.1 Состав жирных кислот клеток *C. algorithum* при оптимальной и отрицательной температурах культивирования

Для жирнокислотного состава липидов мембран *C. algorithum* характерно преобладание тетрадекановой и омега7-цис-гексадеценовой кислот. Содержание непредельных соединений в мембранах при оптимальной температуре составляло 57%. Клетки, выращенные при отрицательной температуре, содержали 68.8% ненасыщенных соединений. При этом уменьшалось процентное содержание тетрадекановой, пентадекановой, гексадекановой и октадекановой кислот и значительно увеличивалось содержание омега7-цис-гексадеценовой кислоты (табл. 32).

7.2.2 Состав жирных кислот липидов мембран '*P. muriicola*' 2pS^T при различных температурах культивирования и соленостях среды

На примере штамма '*P. muriicola*' штамм 2pS^T изучали изменения в жирнокислотном профиле клеток, выращенных при различных температурах (-2, 20 и 28°C) и концентрациях NaCl в среде.

В целом жирнокислотный состав липидных комплексов мембран штамм 2pS^T характеризовался высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот - омега7-цис-гексадеценовой, омега8-гептадеценовой, омега9-октадеценовой и омега7-октадеценовой, которые в сумме при оптимальной температуре культивирования и солености среды составляли 79.8%. Как показали результаты экспериментов, культивирование при температуре, ниже оптимальной (-2°C) или выше (28°C) не приводило к значительным сдвигам в соотношении сумм насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (табл. 30). Культивирование при повышенной солености приводило к небольшому увеличению доли ненасыщенных жирных кислот при оптимальной и отрицательной температурах. Содержание короткоцепочечных жирных кислот (декановой и гидроксидодекановой) также значительно не менялось. Интересным результатом эксперимента оказалось появление некоторых соединений, не характерных для бактерий рода *Psychrobacter*, при -2 °C и повышенной солености (50 г/л) таких кислот как C_{15:1ω6}, C_{17:0 10 Me}, C_{18:0 10 Me}, C_{20:1ω9t} и насыщенный альдегид C_{11:0}.

Таблица 32. Влияние условий культивирования на состав жирных кислот клеток *P. muricola* 2pS^T.

Соединение, %	Соленость, г/л					
	5.0			50.0		
	Температура, °C					
	-2	18-20	28	-2	18-20	28
9:0	0.26	0.32	0.66			0.72
10:0	3.94	3.61	4.54	2.59	4.74	4.29
i11	0.06	0.12	0.17			0.27
a11:0				0.17		
11:0		0.16	0.36	0.23	0.23	0.40
12:0	0.11	0.13	0.15	0.11	0.15	0.10
3h12	0.72	0.96	1.03	0.51	0.84	1.10
14:0	0,15	0,21	0.14		0.23	
3h13			0.16			
15:1ω6				0.16		
15:0	0.13	0.21	0.18			
16:1	0.57	0.24	0.20	0.46		0.27
16:1ωΔ7c	9.48	6.54	4.49	7.89	8.94	4.37
16:1ω7t	3.64	1.47	0.46	0.97	0.76	0.62
16:0	1.49	2.28	1.86	0.74	2.22	1.60
3hi15	0.44	0.36	0.22	0.15		0.35
i17	0.69	0.72	0.85	1.01	0.46	1.27
17:1ω8	4.88	5.27	9.43	8.76	5.50	9.20
17:1ω6	2.31	1.81	1.38	1.70	0.61	1.72
17:0	0.49	0.66	1.32	0.24	0.38	0.67
17:0 10 Me				0.25		
18:1ω9	42.04	45.76	56.98	53.00	57.30	49.61
18:1ω7	18.13	15.94	7.98	12.78	11.46	11.75
18:0	2.45	3.02	4.89	1.55	3.36	2.87
18:1ω11 Me	1.30	2.78	1.57	2.71		3.79
3hi17	0.50	1.56		0.80		2.29
18:0 10 Me				0.27		
i19	0.14	0.25	0.42	0.18		
20:1ω9t				0.58		
20:0	5.99	5.63	0.53	2.22	2.83	2.72
Насыщенные жирные кислоты, % от общей суммы	16.9	18.2	16.6	9.1	15.2	16.0
Ненасыщенные жирные кислоты, % от общей суммы	82.4	79.8	82.5	88.3	84.6	81.3

7.3 Внутриклеточный полисахарид *C. algorithilum*

Одним из важных способов выживания микроорганизмов является образование внутриклеточных полимерных веществ (полисахаридов, липидов, полифосфатов). Эти соединения могут быть источниками углерода и (или) энергии в условиях, когда приток последних ограничен. Внутриклеточное накопление полимерных соединений (полисахаридов и полигидроксibuтирата) является типичным для клостридий.

Внутриклеточные полисахариды клостридий представляют собой гликогенподобные или крахмалоподобные полимеры, составленные из глюкозных единиц, соединенных α -(1-6) связями (Hirpe *et al.*, 1991). Эти соединения выполняют, как правило, резервную функцию (Ballicora *et al.*, 2003), но не ограничиваются ею. Внутриклеточные полисахариды могут служить эндогенными субстратами для спорообразования и поставщиками энергии для дифференцировки. При исследовании ультратонких срезов клеток *C. algorithilum* 14D1, выращенных при оптимальной и отрицательной температурах, обнаружился различный характер заполнения цитоплазмы (данные не представлены). Цитоплазма клеток, выращенных при оптимальной температуре (5°C), была заполнена электронпрозрачным веществом. Клетки, выращенные при -5°C имели совершенно другой характер заполнения цитоплазмы: электронпрозрачного вещества было значительно меньше. Это навело нас на мысль о том, что, возможно, накопление данного вещества является процессом, зависящим от температуры культивирования.

7.3.1 Состав и свойства

Гомогенаты клеток окрашивались раствором Люголя в темно-коричневый цвет, поэтому мы предположили, что в цитоплазме содержится полисахарид. Схема анализа подробно изложена в работе Печерициной с соавторами (2011). В препарате полисахарида отсутствовал белок и нуклеиновые кислоты. Элементный анализ не обнаружил *N*, в то время как количество *C* составило 41%, а *H* – 6.6%, количество PO_4 – 0.27%.

Для дальнейшей идентификации полисахарида использовали кислотный и ферментативный гидролиз с последующим обнаружением продуктов гидролиза методом жидкостной хроматографии высокого давления. Среди продуктов полного кислотного гидролиза была обнаружена только глюкоза. После энзиматического гидролиза полисахарида с помощью амилоглюкозидазы (1,4- α -D-глюканглюкогидролаза, К.Ф.3.2.1.3) в среде инкубации также выявлялась глюкоза (93%), с помощью β -амилазы (1,4- α -D-глюкан-мальтогидролаза, К.Ф. 3.2.1.2) – только мальтоза.

Раствор Люголя окрашивал раствор полисахарида в коричневый цвет, что характерно при образовании комплекса иод-гликоген. После гидролиза амилоглюкозидазой полисахарид терял способность связывать иод: величина экстинкции комплекса при длине волны 495 нм составила 0,489, в то время как гидролизованного препарата не отличалась от контроля, которым служил 10-кратноразбавленный раствор Люголя. Таким образом, в клетках *C. algorithum* 14D1 накапливается гликогенподобное соединение, состоящее из остатков D-глюкозы, соединенных преимущественно α -1-4 связями.

7.3.2 Условия накопления

Исследование динамики накопления полисахарида клетками *C. algorithum* в процессе роста культуры (рис. 42) показало, что отношение полисахарид/сухой вес оставалось относительно постоянным на протяжении роста культуры и составляло 25-28% при начальной концентрации глюкозы 2 г/л. Для дальнейших количественных определений полисахарида брали клетки из поздней экспоненциальной фазы.

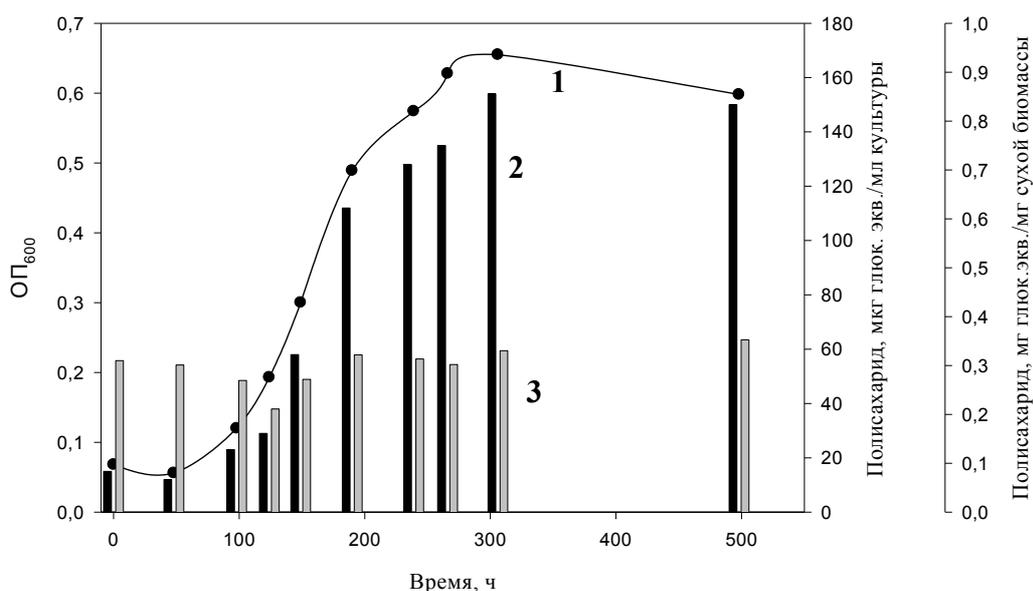


Рис. 42. Изменение содержания внутриклеточного полисахарида *C. algorithum* в процессе роста при оптимальной температуре. 1 - оптическая плотность; 2 - содержание полисахарида в единице объема культуры, мкг глюкозных эквивалентов/мл; 3 - относительное содержание полисахарида в клетке, мкг глюкозных эквивалентов/ мг сухой биомассы.

Тип субстрата также оказывал влияние на содержание полисахарида в клетках *C. algorithum*. Наибольшее количество полисахарида образовывалось на глюкозе - 29 %, на трегалозе - 20%. Клетки, выращенные на пептоне, содержали не более 5% полисахарида

от веса сухих клеток. Как видно из данных табл. 33, по мере возрастания концентрации глюкозы количество полисахарида возрастало.

Таблица 33. Зависимость количества внутриклеточного полисахарида в клетках *S. alboriphilum* от типа субстрата и концентрации глюкозы и типа субстрата.

Субстрат, мг/л	Полисахарид, мг глюк.эquiv./мг сухих клеток
Глюкоза, 100	0.15
Глюкоза, 250	0.19
Глюкоза, 1000	0.23
Глюкоза, 2000	0.29
Глюкоза, 4000	0.33
Трегалоза, 2000	0.20
Пептон, 2000	0.05

Рост в лимитирующих условиях по азоту сопровождался образованием внутриклеточного полисахарида, который составлял около 50% веса сухих клеток при концентрации глюкозы 2 г/л. Помещение клеток, выращенных при концентрации глюкозы 2 г/л и содержащих 27% полисахарида, в среду без субстрата приводило к снижению количества внутриклеточного полисахарида до 17% за 7 суток.

Клетки, выращенные при различных температурах, содержали разное количество полисахарида (табл. 34). Оптическая плотность культуры, выращенной при 12°C, не превышала 0.21, при этом количество внутриклеточного полисахарида незначительно снижалось по сравнению с вариантом роста при оптимальной температуре. Максимальное соотношение полисахарида и биомассы наблюдалось при 0 и 5°C.

Изучение одновременного влияния температуры и солености на накопление полисахарида выявило, что его наибольшее количество образуется в клетках, выросших в среде с наибольшим содержанием соли при наименьшей температуре (табл. 35). При 12°C и солености 5 г/л наблюдалось уменьшение его количества до 10% от веса сухих клеток без увеличения плотности культуры. Возможно, резко неоптимальные условия культивирования бактерии вызывают нарушение транспорта глюкозы, и организм выживает за счет эндогенного субстрата.

Известно, что использование стрессовых факторов (повышенной температуры, солености и обработки перекисью) приводит к индукции генов, кодирующих синтез гликогена в клетках дрожжей (Parrou et al., 1997). Эти данные позволили предположить, что накопление полисахарида штаммом 14D1^T так же может быть температурно-

зависимым процессом. Однако данные, представленные в таблицах 34 и 35, не выявили существенного влияния температуры и температуры и солености на накопление гликогена: наблюдалось его незначительное увеличение.

Таблица 34. Накопление полисахарида клетками *C. algoriphilum* 14D1 при различных температурах культивирования.

Температура роста, °С	OD ₆₀₀ max	Время удвоения, ч	Кол-во полисахарида, мкг глюк. экв./мкг сухих клеток,
-5	0.86	432	0.23
0	0.80	67	0.36
5	0.69	20	0.27
12	0.12	76	0.22

Таблица 33. Влияние температуры и солености на содержание внутриклеточного полисахарида штамма 14D1.

Концентрация NaCl, г/л	Конечная концентрация полисахарида (%) при различных температурах культивирования		
	12°С	5°С	-5°С
5	10	19	27
50	27	27	32
100	27	27	31
150	27	32	33

Количество полисахарида клеток *C. algoriphilum* в единице объема культуры увеличивалось с увеличением оптической плотности культуры (рис.42), но по отношению к единице массы сухих клеток оставалось постоянным. Известно, что гликогенподобный полимер клеток *C.thermocellum* (Головченко и др., 1986) разлагался после прекращения роста культуры, и, как предполагают авторы, использовался при спорогенезе. Два штамма *C.pasterianum*, один из которых хорошо образовывал споры, а другой плохо, отличались по характеру накопления полисахарида (Mackey and Morris, 1971). Первый штамм накапливал полисахарид только к началу стационарной фазы в количестве, достигающем 60% от веса сухих клеток. Второй – образовывал полисахарид во время всей фазы роста, но его содержание не превышало 15%. Второй тип синтеза эндополисахарида свойственен исследуемой психрофильной бактерии, которая плохо образует споры: только помещение культуры в воду криопэга приводило к образованию спор.

Таким образом, наличие полисахарида в клетках *C.algoriphilum*, когда бактерия находится в привычной для нее среде обитания, возможно, способствует спорогенезу. Общеизвестным фактом является то, что цитоплазма клетки является физической средой для осуществления биохимических событий. Вполне возможно, полисахарид бактерии не

только напрямую участвует в биохимических реакциях. Он может способствовать образованию оптимальной цитоплазматической вязкости для низкотемпературного протекания биохимических процессов. А это, в свою очередь, приводит к выживанию *C.algoriphilum* в условиях криопэга. Полученные нами данные показали, что внутриклеточный полисахарид *C. algoriphilum* по составу и структуре существенно не отличается от таковых мезофильных и термофильных клостридий (Strasidine, 1971; Головченко *и др.*, 1986).

Нам представляется очевидным, что внутриклеточный полисахарид *C. algoriphilum* играет роль резервного вещества. По Уилкинсону (Wilkinson, 1959), вещество выполняет функцию запасаения энергии, если удовлетворяются следующие требования: вещество накапливается в условиях, когда приток энергии из экзогенных источников в избытке по отношению к тому, который необходим для роста; утилизируется, если приток энергии недостаточен для поддержания роста, деления и обеспечения жизнеспособности; вещество деградирует, образуя энергию в форме, доступной для утилизации клеткой, что дает ей биологические преимущества по сравнению с клетками, которые не имеют такого вещества.

Результаты наших экспериментов показывают, что первые два условия удовлетворяются: когда рост ограничен недостатком источника азота, полисахарида накапливалось примерно в 2 раза больше, чем в оптимальных условиях, а помещение клеток в среду без субстрата приводило к потреблению полисахарида.

Полученные данные не позволяют утверждать, что внутриклеточный полисахарид непосредственно участвует в адаптации *C. algoriphilum* к условиям криопэга. Возможно, ответить на этот вопрос могли бы эксперименты с мутантами, лишенными способности синтезировать внутриклеточный полисахарид.

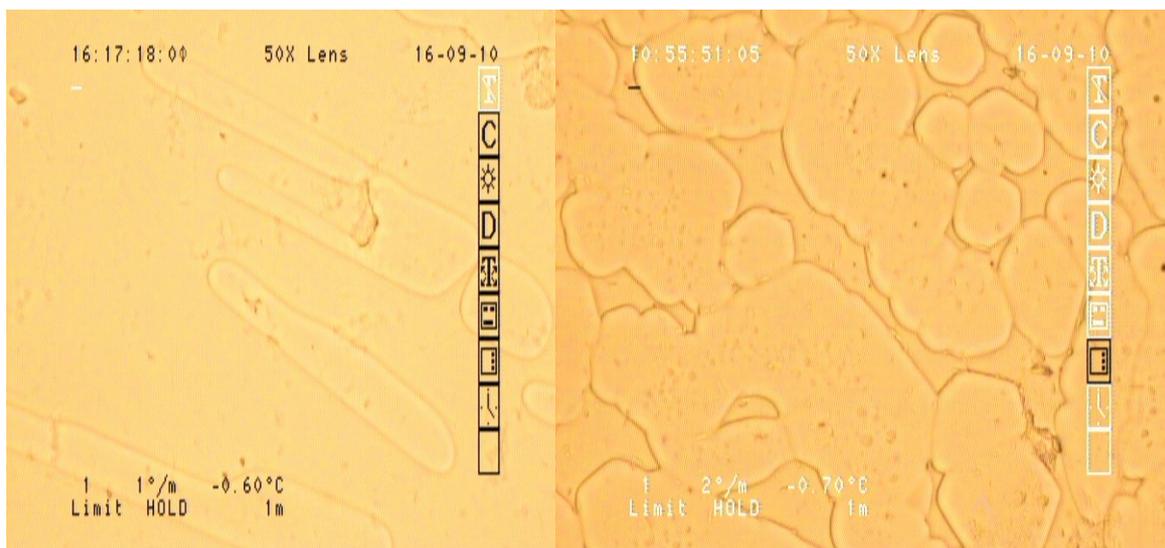
7.4 Антифризный белок *C.tagluense* A121^T

Психрофильные и психроактивные микроорганизмы продуцируют различные соединения, чтобы защитить себя от внутриклеточного замерзания или свести к минимуму вредное воздействие формирования кристаллов льда (Saunders *et al.*, 2003; Medigue *et al.*, 2005; Methé *et al.*, 2005; D'Amico *et al.*, 2006; Kurihara *et al.*, 2008; Riley *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2017). Антифризные белки (antifreeze proteins, AFPs) являются лед-связывающими белками (Ice-binding proteins, IBPs) которые обладают способностью изменять кристаллическую структуру льда и подавляют рост льда в двух направлениях (Casanueva *et al.*, 2010; Bar Dolev *et al.*, 2016).

Результаты, свидетельствующие об обнаружении AFPs с высокой активностью в клетках микроорганизмов различных физиологических групп, ясно показывают, что микробные AFPs являются потенциальными кандидатами на промышленное использование подобных субстанций. Выделение антифризных белков из других, адаптированных к холоду микроорганизмов, дадут представление о тонкостях клеточных механизмов адаптации, а также расширят возможности коммерческого использования AFPs.

Все культуры анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых отложений, а также некоторые коллекционные штаммы, выделенные из холодных мест обитания, были протестированы на наличие AFPs. Образование кристаллов наблюдали в нативных образцах культуральной жидкости, а также в клетках, разрушенных ультразвуком (табл. 20). Как показали результаты, из 23 протестированных штаммов только разрушенные ультразвуком клетки бактерии *C. tagluense* A121^T содержали AFP, что выявлялось в виде образования кристаллов правильной формы при охлаждении. Для сравнения на рис. 43 представлены данные охлаждения *M. arcticum* M2^T и штамма A121^T.

В дальнейшем была предпринята попытка выделить AFP из биомассы *C. tagluense* A121^T, выращенной при оптимальной температуре культивирования. Однако, AFP обнаружен не был. Как показали последующие эксперименты, антифризная активность у штамма A121^T индуцировалась пониженной температурой: клетки, выращенные при 4°C содержали АТР. К настоящему времени попытки выделить и очистить этот белок в связи с техническими трудностями не увенчались успехом.



a)

б)

Рис. 41. Микрофотографии структур, образующихся при охлаждении *M. arcticum* M2^T (а) и *C. tagluense* A121^T (б). Наблюдения проводились при увеличении 40х в проходящем свете.

В 2016 году в Национальном Институте Полярных исследований был секвенирован геном *C. tagluense* A121 (MiSeqIllumina). Результаты анализа генома показали, что секретлируемый антифризный белок кодируется уникальными генами, образующими отдельную ветвь среди известных антифризных белков (рис. 43). Не смотря на то, что полученные данные требуют дополнительного анализа, они, безусловно, свидетельствуют о том, что микроорганизмы вечной мерзлоты является важным резервуаром новых AFPs. AFPs считаются перспективным биотехнологическим продуктом для применения в медицине и пищевой, косметической, топливной и других отраслях промышленности. Нами впервые показано наличие AFP в клетках анаэробной бактерии, и дальнейшие исследования позволят определить уникальность обнаруженных белков.

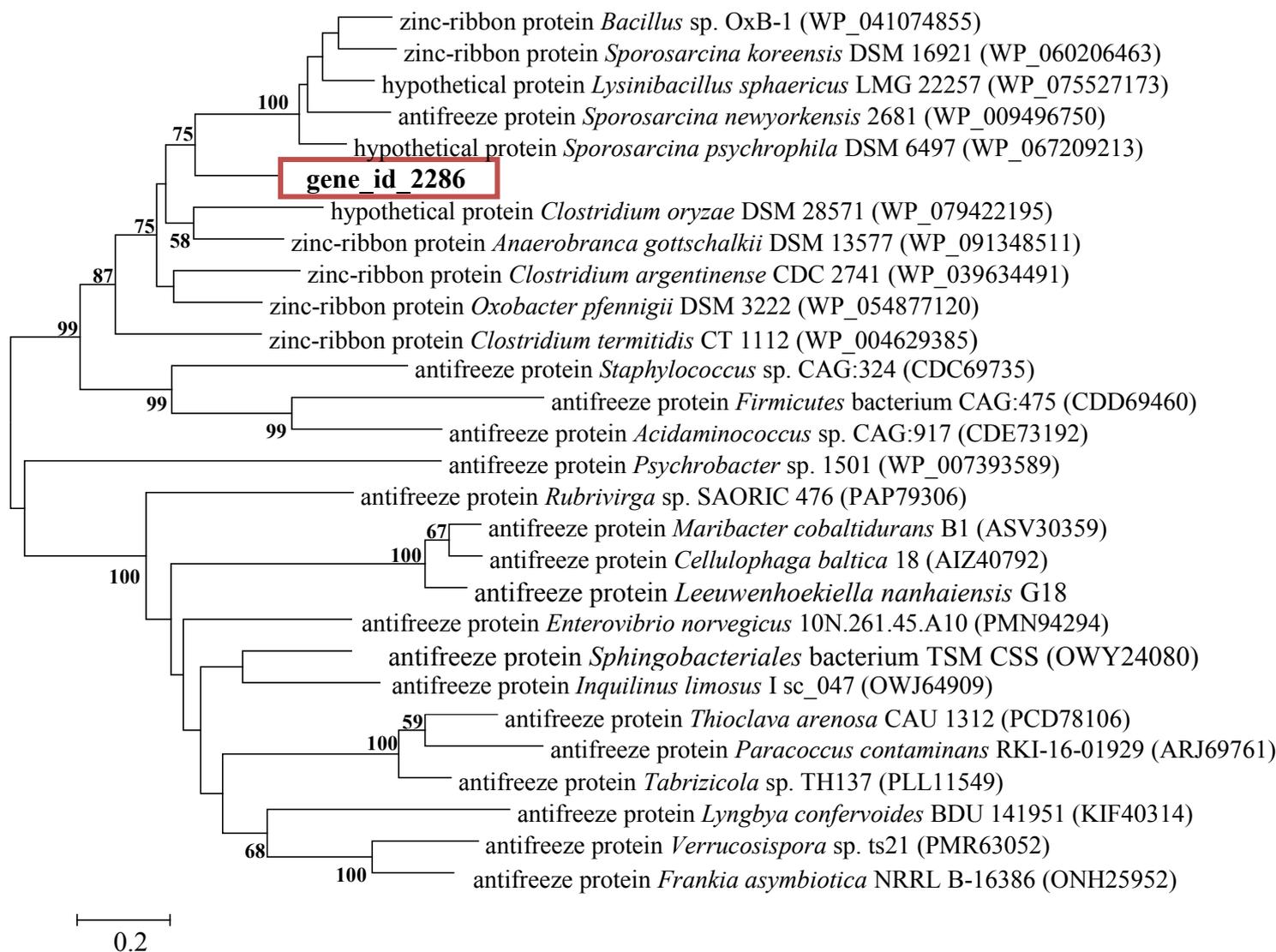


Рис. 44. Филогеномная дендрограмма, показывающая положение гена антифризного белка из *C. tagluense* (gene_id_2286) среди близкородственных белков.

ГЛАВА 8. МЕТАНОГЕНЫ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ – МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ АСТРОБИОЛОГИИ

Изучая микроорганизмы в таких экстремальных условиях как экосистемы Арктики, мы приближаемся к пониманию того, какие жизненные формы могут населять планеты криогенного типа. Вечная мерзлота представляет собой природное хранилище древних микроорганизмов, которые при постоянных отрицательных температурах сохраняют жизнеспособность намного дольше, чем в любых известных местах обитания, а обнаруженные в криосфере Земли жизнеспособные клетки, возможно, представляют собой аналоги бывшей или нынешней жизни внеземных экосистем. Одним из самых привлекательных объектов для поиска жизни является Марс, земной моделью экосистемы которого является криобиосфера и сохранившиеся в ней микроорганизмы.

Первыми, кто выдвинули идею использования модели земной мерзлоты для решения проблем экзобиологии, были Кэмерон и Морелли (Cameron and Morelli, 1974). В настоящее время известно, что верхние 20-50 см поверхности Марса представляют собой слой рыхлого сухого мерзлого грунта, а последующий метр определяется как вечная мерзлота (Rummel *et al.*, 2014). Результаты исследований, полученные с орбитального аппарата «Марс Одиссей», показали, что на этой планете есть обширные залежи льда (Boynnton *et al.*, 2002; Demidov *et al.*, 2008; Cull *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014), что представляет перспективу для определения внеземной жизни, в частности психрофильной.

Интерес к метаногенам, как модельным объектам для решения проблем астробиологии возник в конце 20 века, а возобновился с обнаружением в атмосфере Марса метана (Mumma *et al.*, 2003; Formisano *et al.*, 2004; Krasnopolsky *et al.*, 2004; Mumma *et al.*, 2009). Было показано, что присутствие атмосферного метана указывает на его постоянное пополнение (Hitchcock and Lovelace, 1967). Это может происходить благодаря метаболизму микроорганизмов, либо быть следствием абиотических процессов (вулканы, и т.д.).

Метаногенные археи рассматривались в качестве модельных организмов для возможных форм жизни еще до того, как метан был обнаружен в атмосфере Марса (Иванов, Леин, 1991; Boston *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 2000). Анаэробные хемолитотрофные психротолерантные метаногенные микроорганизмы с их способностью усваивать углекислый газ и другие неорганические соединения являются достаточно подходящими моделями для форм жизни, которые могут существовать в замороженных подповерхностных средах на Марсе, где недоступны органические соединения, нет свободного кислорода и крайне низкое количество незамерзшей воды. В этой работе мы

протестировали способность метаногенов, выделенных из мерзлоты, выдерживать влияние перхлоратов, а так же воздействие УФ-облучения и вакуумирования, как факторов грунта Марса и космоса, соответственно.

8.1 Исследование влияния перхлоратов

Впервые в мае 2008 года лабораторией Wet Chemistry (USA) был выполнен влажный химический анализ марсианского грунта, который характеризовался небольшой щелочностью и низкой концентрацией солей (Hecht *et al.*, 2009). В составе катионов присутствовали преимущественно Mg^{2+} и Na^+ , и в небольшом количестве K^+ и Ca^{2+} . К удивлению исследователей, были обнаружены перхлораты (0.6%) (ClO_4^-), вероятнее всего $Ca(ClO_4)_2$ или $Mg(ClO_4)_2$. Высокий восстановительный потенциал перхлората (ClO_4^- / Cl^- $E_0 = 1,287$ V) делает его идеальным акцептором электронов для микробного метаболизма. Однако, до сих пор среди архей известен единственный вид неметаногенных представителей, которые восстанавливают перхлорат (Liebensteiner *et al.*, 2013; Oren *et al.*, 2014; Martínez-Espinosa *et al.*, 2015), и не ясно, являются ли эти соединения стрессорами для метаногенов.

В нашем исследовании в качестве объектов участвовали три штамма метаногенных архей *M. veterum* МК4^T, *M. articum* M2^T, и штамм JL01, выделенные из многолетнемерзлых отложений различного возраста. Для сравнительных экспериментов были использованы штаммы *M. bryantii* М.о.Н^T и *M. mazei* S6^T.

Для того, чтобы определить ингибирующее действие перхлоратов, в культуральные среды для метаногенов добавляли перхлораты в концентрациях до 10 мМ (согласно исследованиям, в экстрактах марсианского грунта максимально возможное содержание соли составляет именно 10 мМ (Hecht *et al.*, 2009)). Полученные результаты показали, что внесение в питательную среду от 2.1 до 9.0 мМ $Mg(ClO_4)_2$ приводило к снижению продукции метана у всех метаногенных штаммов на 20%. Следует отметить, что *M. articum* M2^T был наиболее устойчив к действию этих солей. Что касается *M. bryantii* М.о.Н^T, добавление 9.0 мМ $Mg(ClO_4)_2$ и 9.8 мМ $NaClO_4$ снижало метанобразование данного штамма на 80%. Совместное добавление перхлоратов натрия и магния во всех случаях усиливало ингибирующий эффект. Концентрации, при которых эти соли ингибируют рост клеток (табл. 35) соответствуют их активности как хаотропных стрессоров (Bhaganna *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2015), которые разупорядочивают клеточные макромолекулы.

Таблица 34. Ингибирующее действие $Mg(ClO_4)_2$ и $NaClO_4$ на рост метаногенных архей различного происхождения.

Штаммы	$Mg(ClO_4)_2$, мМ			$NaClO_4$, мМ			$Mg(ClO_4)_2 + NaClO_4$, мМ		
	*IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
<i>M. bryantii</i> , М.о.Н ^T	3.5	6.2	9.0	2.8	6.0	9.8	2.2	4.0	8.1
<i>M. arcticum</i> , М2 ^T	9.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
<i>M. veterum</i> МК4 ^T	2.6	6.6	>10.0	4.1	8.4	>10.0	2.5	5.6	9.0
<i>M. mazei</i> , S-6 ^T	5.0	9.2	>10.0	7.8	>10.0	>10.0	4.8	>10.0	>10.0
<i>M. mazei</i> , JL01	2.1	5.2	>10.0	3.9	9.7	>10.0	1.8	4.8	>10.0

*- IC_{20,...50} - концентрации перхлоратов, вызывающие 20, 50 и 80%-ное ингибирование метаногенеза

Рост и метаногенез исследуемых метаногенных архей проверяли на среде с добавлением перхлоратов в концентрации 5 мМ. Результаты показали крайне низкую продукцию биомассы и, как следствие, низкое содержание метана в газовой фазе. Исследование влияния перхлората магния и натрия на метаногенез водородпотребляющих метаногенов показало, что метаногены, выделенные из многолетнемерзлых отложений, оказались более устойчивы. Рост *M. bryantii* ингибировался в большей степени, чем рост *M. veterum* МК-4^T и *M. arcticum* М2^T. Штамм *M. arcticum* М2^T отличался лучшим ростом в присутствии перхлоратов, однако продукция метана штаммом снизилась на 20% по сравнению с контролем, не содержащим перхлораты (Shcherbakova *et al.*, 2015). Что касается *Methanosarcina* spp., присутствие в среде перхлоратов замедляло процесс роста в большей степени, кроме этого, у штамма JL01 наблюдалось удлинение лаг-фазы до девяти дней (Shcherbakova *et al.*, 2015). Исключение составил штамм *Methanosarcina mazei* S-6^T, который на среде с перхлоратом натрия образовывал метана больше и с большей скоростью, чем на обычной среде. Поскольку считается, что одним из основных условий для выживания на Марсе является галотолерантность, главными обсуждаемыми аналогами внеземных экосистем, в частности Марса, в первую очередь, являются гиперсоленые источники на Земле, особенно регионы многолетнемерзлых отложений (Rummel *et al.*, 2014).

Ранее, изучение микроорганизмов криопэгов Арктики показало, что большинство из них являются не галофильными, но галотолерантными представители доменов *Eukarya*, *Bacteria* и *Archaea* (Gilichinsky *et al.*, 2003). Кроме того, мы получили данные, свидетельствующие о том, что при снижении температуры культивирования происходит увеличение галотолерантности у негалофильных психрофильных и психротрофных бактерий, выделенных из криопэгов (Shcherbakova *et al.*, 2004). В то же время, существуют доказательства того, что хаотропные вещества (в том числе соли одновалентных и двухвалентных металлов) могут фактически способствовать увеличению метаболической активности и увеличению популяции микроорганизмов при очень низких температурах, за счет способности клеток поддерживать биологическую текучесть мембран (Cray *et al.*, 2015; Stevenson *et al.*, 2015).

Исследованные метаногены не являются галофилами, но все штаммы растут в присутствии NaCl в среде в концентрациях до 0.3 М (Shcherbakova *et al.*, 2011). В отличие от *M. bryantii* М.о.Н.^Т и *M. veterum* МК4^Т, которые лучше всего растут в пресной среде, *M. arcticum* М2^Т рос с максимальной скоростью при концентрации NaCl 0.1 М. Возможно это различие в физиологии исследуемых метаногенов объясняет, почему реакция на стресс, в данном случае на влияние перхлоратов, отличается. Дальнейшие исследования прояснят, являются ли перхлораты и другие соли стрессорами или они действительно могут улучшать или ингибировать рост при пониженных температурах.

При исследовании результатов роста метаногенов в присутствии сильных окислителей возник другой вопрос, а именно, могут ли метаногены использовать ClO₄⁻ в качестве акцептора электронов при окислении метана, поскольку ранее было показано, что метаногенные археи родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum* и *Methanosarcina* могут образовывать и в то же время окислять метан. Зендером с соавторами (Zehnder and Schnellen, 1979) было показано, что по сравнению с количеством образующегося метана, количество метана, одновременно окисленного изученными метаногенами, колебалось от 0.001 до 0.3%, в зависимости от штамма.

Для проверки данного предположения мы проследили за изменением концентрации перхлоратов в среде культивирования через девять дней роста *Methanobacterium* spp. и шестнадцать дней для *Methanosarcina* spp. Следует отметить, что в случае *Methanosarcina* spp. снижение содержания перхлоратов было менее, чем 10% от общего количества, первоначально добавленного в среду, включая контроль.

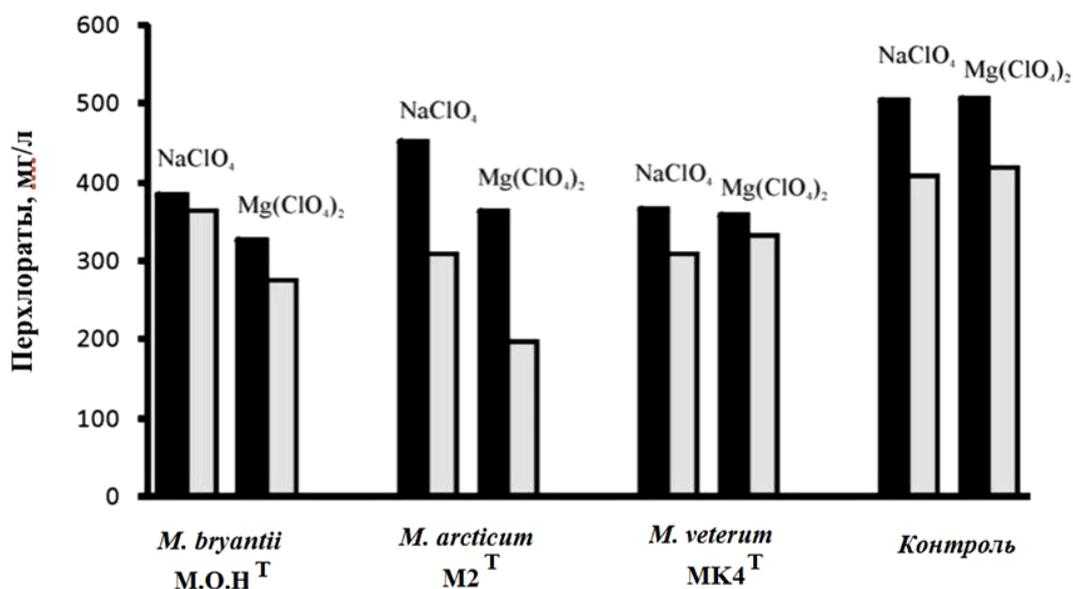


Рис. 45. Содержание перхлоратов при культивировании водородпотребляющих метаногенов. Черные столбики - концентрация перхлоратов среде в начальной точке; серые столбики - концентрации перхлоратов через девять дней роста. В качестве контроля использовалась среда с перхлоратами.

Изменение содержания NaClO₄ (5.7-16.1%) у *M. bryantii* M.o.H^T и Mg(ClO₄)₂ (16.0-7.2%) у *M. veterum* MK4^T не превышало уменьшение концентрации перхлоратов в контроле (19.0 и 17.6%, соответственно). Однако у штамма *M. arcticum* M2^T содержание NaClO₄ в культуральной среде снизилось до 31.8%, а Mg(ClO₄)₂ - до 45.6% (рис. 45).

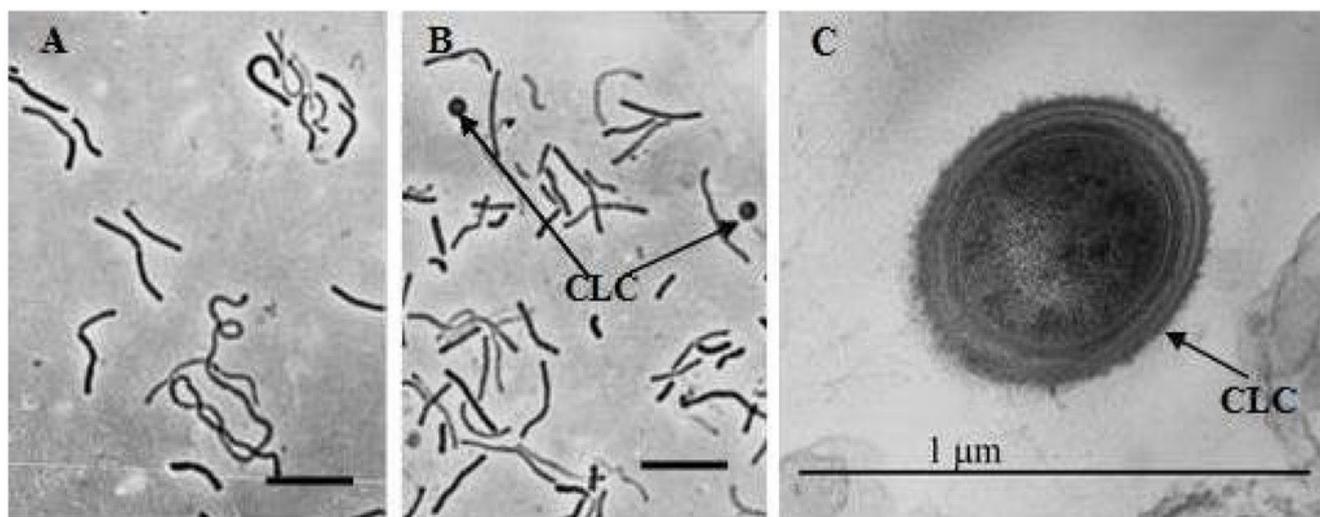


Рис. 46. Микрофотографии штамма *M. arcticum* M2^T. Клетки без перхлората (A) и с Mg(ClO₄)₂ в среде (B, C): A, B - фазовый контраст, величина масштабной метки 10 мкм; C - ультратонкий срез. Условные обозначения: CLC-цистоподобная клетка.

Таким образом, уменьшение концентрации перхлоратов в процессе роста штамма свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Этот результат, несомненно, требует экспериментального подтверждения, но, тем не менее, он открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии метаногенами, в том числе во взвешенных условиях.

Влияние перхлоратов на морфологию клеток *M. arcticum* M2^T. Для выявления причины высокой устойчивости штамма *M. arcticum* M2^T к действию перхлоратов было добавлено $Mg(ClO_4)_2$ как сильного окислителя. Как правило, клетки штамма представляют собой неподвижные, слегка изогнутые палочки (рис. 46, А) шириной 0.45-0.50 мкм и длиной 3.0-6.0 мкм, и часто образуют цепочки и нити длиной более 30 мкм. Ранее было показано, что при длительном хранении штамм *M. arcticum* M2^T образует цистоподобные кокковидные клетки (Shcherbakova *et al.*, 2011). При наличии перхлората образование цистоподобных клеток начиналось в логарифмической фазе роста (Рисунок 46, Б). Цитоплазма цистоподобных клеток была более плотной, кроме того наблюдались дифференцированные поверхностные слои (рис. 46, В). Способность образовывать такие морфотипы отличает *M. arcticum* M2^T от других метаногенов, используемых в исследовании, и, вероятно, делает этот штамм, устойчивым к перхлоратам.

Таким образом, метанобразующие микроорганизмы, выделенные из многолетнемерзлых отложений, были устойчивы к окислителям, таким как перхлораты, а штамм *M. arcticum* M2^T, вероятно, может использовать перхлорат в качестве акцептора электронов в АОМ.

Несмотря на то, что понимание механизмов получения метана археями приводит, в первую очередь, к метаногенам, населяющим органически богатые среды, некоторые особенности остаются применимы и к органически бедным средам (Ferry *et al.*, 2010), а это может стать основой для разработки экспериментов по выявлению автотрофных метанобразующих форм жизни на Марсе.

8.2 Влияние на метаногенов ультрафиолетового облучения как фактора космического пространства

Целью этого эксперимента был выбор метаногенной археи для участия в эксперименте «ТЕСТ», который заключается в длительной экспозиции микроорганизмов на поверхности Международной космической станции. Предполагаемое время нахождения в космическом пространстве 12 мес. В тестировании участвовали три автотрофных (субстрат H_2 и CO_2) штамма (МК4^T, M2^T и М.о.Н^T), относящихся к роду *Methanobacterium* и представляющих собой палочки различного размера. Другие два

штамма представляли род *Methanosarcina*, который обладает самой широкой субстратной специфичностью среди метанобразующих архей. Часть штаммов была выделена из многолетнемерзлых пород Арктики и адаптирована к перепаду температур – от отрицательных до положительных.

Облучение высокими дозами УФ (суммарная доза 6.06 кДж/см²) привело к полной гибели клеток штаммов *M. veterum* МК4^T, *M. articum* М2^T, *M. bryantii* М.о.Н^T и *M. mazei* S-6^T. Однако, в отличие от перечисленных микроорганизмов, штамм *M. mazei* JL01 через 10 дней начал продуцировать метан до контрольных значений (рис. 47). В качестве примера гибели клеток приведены данные для штамма S-6^T (Рис. 47, а). Аналогичная картина была зафиксирована для штаммов М.о.Н.^T, М2^T и МК4^T (данные не представлены).

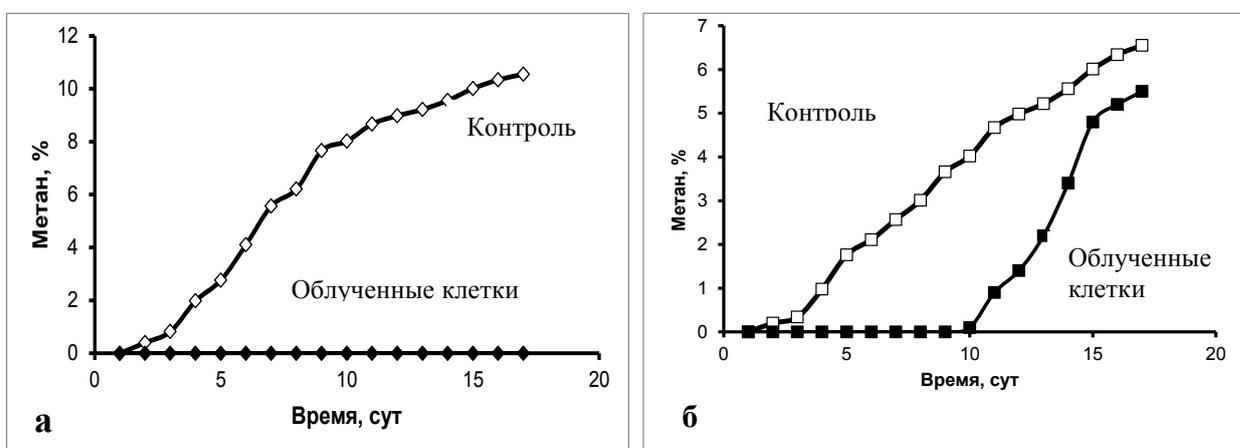


Рис. 47. Образование метана штаммами *Methanosarcina mazei* S-6^T (а) и JL01 (б) в пересеве после облучения высокими дозами УФ (6.06 кДж/см²).

Облучение дозами УФ, моделирующими условия космоса. Для этого эксперимента были отобраны штаммы метаногенов имеющие наибольшую вероятность выживания в неблагоприятных условиях: *M. articum* М2^T, *M. mazei* S-6^T, и *M. mazei* JL01. В табл. 36 представлены результаты определения численности метанобразующих архей после воздействия различной дозы УФ.

Как следует из табл. 37 и рис. 48 штаммы, относящиеся к роду *Methanosarcina*, хорошо перенесли условия эксперимента, и их численность не снизилась ниже 86% от первоначальной, а в случае *M. mazei* S-6 облучение мощностью 166.4 Дж/см² привело к увеличению численности метаногена. Клетки водородиспользующего штамма М2^T полностью погибли после облучения мощностью 202.1 Дж/см². Устойчивость анаэробных архей к УФ объясняется особенностями среды, компоненты которой могут поглощать

УФ-лучи. Другой возможный механизм устойчивости метаносарцин может заключаться в наличии SOD и SOR у этих анаэробных прокариот.

Таблица 36. Численность метаногенов после импульсного УФ- облучения.

Название штамма	Численность клеток в контроле*	Численность**, кл/мл		
		Доза облучения, Дж/см ²		
		59.4	166.4	202.1
<i>Methanobacterium articum</i> M2 ^T	4.2 × 10 ⁸	3.15 × 10 ⁸	3.7 × 10 ⁸	0
<i>Methanosarcina masei</i> S-6 ^T	6.7 × 10 ⁷	6.83 × 10 ⁷	6,7 × 10 ⁷	6.63 × 10 ⁷
<i>Methanosarcina</i> sp. JL01	8.2 × 10 ⁷	8.2 × 10 ⁷	7.2 × 10 ⁷	7.05 × 10 ⁷

*- численность метаногенов в пробирках, которые не подвергались воздействию; ** - среднее значение из пяти повторностей.

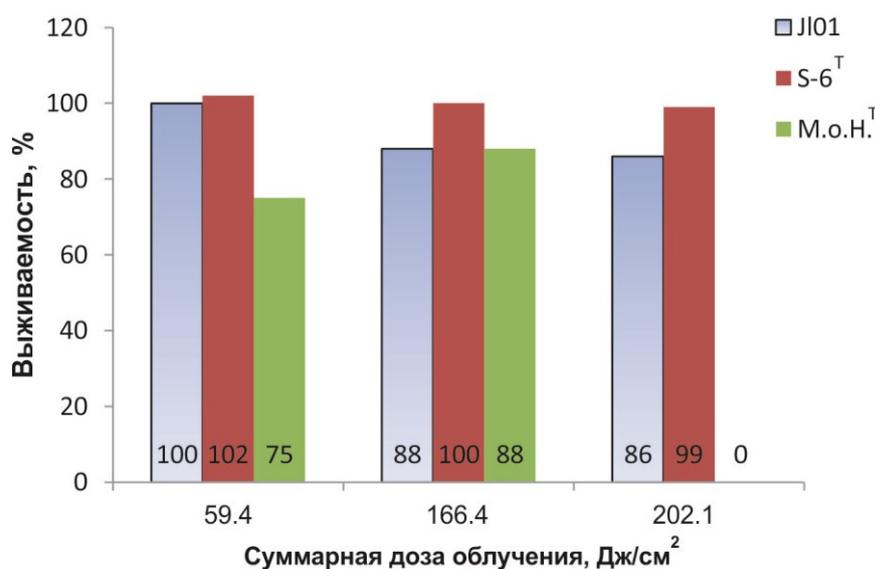


Рис. 48. Выживаемость метаногенных штаммов при различных режимах УФ-облучения. Все тесты проводились в трех повторностях.

Влияние **вакуумирования** на штаммы S-6^T, M2^T и JL01 определяли помещением ватного тампона, пропитанного биомассой метаногена, после обработки вакуумом 10⁻⁵ атм в течение 15 мин (Установка НПО Лавочкин) в пробирку Хангейта с соответствующей для конкретного штамма средой. Культивирование обработанных и контрольных пробирок проводили при оптимальной для каждой культуры температуре в

течение 14 суток. Затем измеряли содержание метана в газовой фазе и сравнивали с контролем (рис. 49).

Таблица 37. Образование метана штаммам *M. arcticum* M2^T и *M. mazei* S-6^T и *Methanosarcina* sp. JL01 после вакуумирования и в контрольных вариантах.

Название штамма	Содержание CH ₄ ,%		Количество образованного CH ₄ *, мкМ
	0 сут*	14 сут*	
JL01, контроль	0.014	0.0096	0
JL01, опыт	0.002	0.0076	следы
M2^T, контроль	0.17	10.3	46.2
M2^T, опыт	0.066	9.90	44.1
S-6^T, контроль	2.62	5.66	13.8
S-6^T, опыт	1.46	7.04	25.4

*-среднее из 5 повторностей

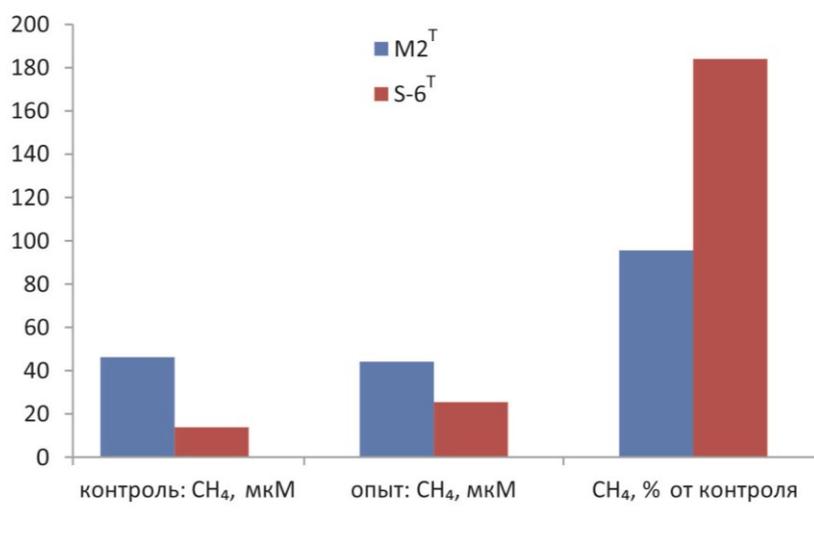


Рис. 49. Образование метана штаммами *M. arcticum* M2^T и *M. mazei* S-6^T после вакуумирования относительно контрольных вариантов. Все тесты проводились в пяти повторностях.

Полученные результаты показали, что штамм JL01 не пережил условия эксперимента, а именно, помещение на тампон в тefлоновую пробирку для переноса в камеру, где проводили вакуумирование. Напротив, после вакуумирования штамм M2^T образовывал метана столько же, а штамм S-6^T почти в два раза больше метана, чем контрольные культуры (табл. 37, рис. 49).

Цитологические изменения в клетках метаносарцин под воздействием УФ-облучения. Сравнение строения клеток штаммов S-6^T и JL01 после больших доз облучения показали, что клеточная стенка штамма S-6^T становится более ригидной (рис. 48, А). Напротив клетки штамма JL01 не изменили форму и по сравнению с клетками, не подверженными облучению имели более однородный состав цитоплазмы и характеризовались отсутствием гранул полифосфатов (рис.48, Б). Возможно наличие грамположительной клеточной стенки у штамма JL01 в отличие от штамма S-6^T, клетки которого окрашиваются по Граму отрицательно, препятствовало гибели всей популяции. Однако, эти предположения требуют отдельного исследования.

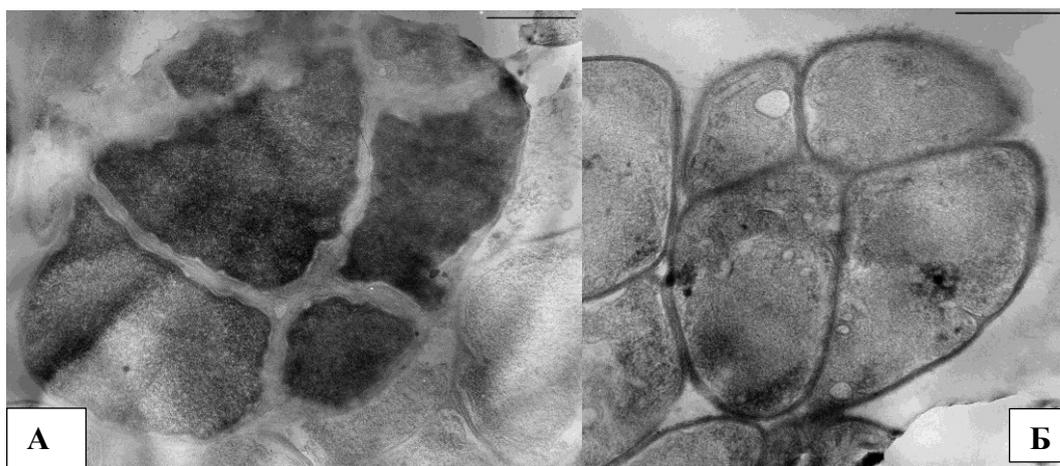


Рис. 50. Ультратонкие срезы клеток штаммов рода *Methanosarcina* после высоких доз УФ-облучения: А - штамм S-6^T; Б - штамм JL01. Величина масштабной метки 1 мкм.

Изучение метаногенов в качестве моделей для внеземной жизни началось еще до обнаружения метана в атмосфере Марса, самой похожей на Землю планете Солнечной системы. Наши исследования показали, что влияние таких условий космического пространства как ультрафиолетовое излучение, вакуум и наличие сильных окислителей (перхлоратов) позволят использовать некоторые виды метаногенов в качестве подобных моделей. Так, *M. mazei* штаммы S-6^T и JL01 сохраняли жизнеспособность после всех исследованных режимов УФ-облучения, а штаммы S-6^T и *M. arcticum* M2^T переносили условия глубокого вакуума. Исследование влияния перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост метаногенов различного происхождения показало, что выделенный из мерзлоты водородпотребляющий метаноген *M. arcticum* M2^T устойчив к действию перхлоратов, что может быть связано со способностью образовывать цистоподобные клетки, установленной для этого вида. Результаты наших исследований согласуются с данными полученными для мезофильных и галофильных метаногенов американскими исследователями (Kral *et al.*, 2016; Mickol *et al.*, 2018; Sinha and Kral, 2018) В процессе

экспериментов с *M. arcticum* M2^T было обнаружено достоверное уменьшение концентрации перхлоратов, что свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Это, в свою очередь, открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии метаногенами, в том числе во взвешенных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиологические исследования мерзлых толщ начинались Д.А. Гиличинским и его коллегами как попытка поиска новых методов в геокриологии. Однако полученные ими результаты создали основу для ряда междисциплинарных исследований, в том числе криомикробиологии и экзобиологии. С использованием экспериментальных данных и эмпирических расчетов (Valentine, 2008) было показано, что в глубинной биосфере, к которой можно отнести и криобиосферу, существует очень низкий оборот энергии, обеспечивающий поддержание клеток микроорганизмов в жизнеспособном состоянии. Преимущество в таких условиях получают клетки анаэробных бактерий и архей, затрачивающие существенно меньше энергии на свое поддержание. Мы предполагаем, что в многолетнемерзлых отложениях и криопэгах может происходить очень медленный оборот биомассы. Для точного подтверждения этих предположений необходимо в одной и той же пробе ММО или криопэга достоверно определить численность определенной функциональной группы бактерий или архей и скорость процесса, который осуществляет эта группа в условиях места обитания. Если преодолеть технические трудности связанные с получением и анализом образцов вечной мерзлоты для статистически достоверных результатов, эти данные позволят определить время оборота биомассы для ММО различного возраста и сравнить его с данными расчетов для прокариотных сообществ глубинной биосферы.

Наши исследования анаэробных микробных сообществ экосистем многолетнемерзлых отложений, полученные с использованием как методов, требующих культивирования микроорганизмов, так и культурально-независимых методов показали, что состав этих сообществ различается для мерзлых толщ и криопэгов. Если терминальной стадией анаэробного разрушения органического вещества, в том числе и биомассы отмерших микроорганизмов, грунтов, является метаногенез, то в криопэгах, заключительную стадию осуществляют сульфатредукторы. Выделенные культуры анаэробных и факультативно-анаэробных криофильных прокариот представляют различные физиологические группы микроорганизмов, осуществляющие процессы отдельных этапов превращения органического вещества в анаэробных условиях, связанных с биогеохимическими циклами углерода, азота и серы.

Нами обнаружены особенности физиологии роста изолятов при отрицательных температурах: сдвиг оптимума солености и расширение пределов толерантности к солености, расширение спектра утилизируемых субстратов, изменение состава продуктов метаболизма при снижении температуры культивирования. Все это, несомненно, являются

следствием изменений метаболизма, за которыми, в свою очередь стоят молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов, понять сущность которых и есть конечная цель исследований механизмов адаптации к отрицательной температуре.

Использование геномных и метагеномных данных в дальнейшем позволит подобрать условия для выделения новых криофильных анаэробных прокариот. Изучение биологических особенностей уже описанных и новых микроорганизмов, а также расшифровка, анализ и сравнение уже полученных геномов позволит понять молекулярные механизмы их адаптации к соответствующим условиям среды и способы выживания в низкоэнергетических средах, которыми являются толщи вечной мерзлоты. Возможно, это позволит обнаружить ранее неизвестные процессы, связанные с новыми источниками энергии для микроорганизмов в подобных экстремальных экосистемах.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведены и суммированы многолетние исследования распространенности, сохранности и состава анаэробных прокариот в экосистемах вечной мерзлоты Арктики, характеризующихся постоянными отрицательными температурами. Показано сохранение жизнеспособных анаэробных бактерий и архей в толщах вечной мерзлоты, находящихся в этом состоянии до 3 миллионов лет.
2. Получена микробиологическая характеристика арктических криопэгов различной минерализации и температуры. Микробные сообщества криопэгов состояли преимущественно из психрофильных и психротолерантных микроорганизмов, а численность анаэробных прокариот составляла от 0.2 до 25% от общей численности популяции.
3. В образцах вечной мерзлоты Арктики установлено широкое распространение некультивируемых архей, принадлежащих филумам *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota*, а в трех наиболее глубоких образцах (возраст 29-32 тыс лет) детектированы представители филума *Woesearchaeota*. Обнаруженные последовательности генов 16S рРНК и *mcrA* метаногенных архей относились к порядкам *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* и *Methanocellales*.
4. Из арктических экосистем выделены и охарактеризованы новые виды психрофильных спорообразующих анаэробных бактерий – *Clostridium tagluense* A121^T, *C. algorithilum* 14D1^T и ‘*C. frigoriphilum*’ 14F^T. Впервые для анаэробов показано образование в клетках штамма A121^T антифризного белка, индуцируемого низкой температурой.
5. Из мерзлых отложений голоценового и плиоценового возраста выделены и охарактеризованы метанообразующие археи, представляющие два новых вида рода *Methanobacterium* – *M. arcticum* M2^T и *M. veterum* MK4^T, а также ацетокластический метаноген *Methanosarcina mazei* штамм JL01. Установлено, что *M. mazei* JL01 находился в тесной метаболической кооперации с сахаролитической бактерией штамм GLS2^T, представляющей новый вид неподвижных спирохет *Sphaerochaeta associata*. Таксономическая принадлежность всех выделенных культур подтверждена сравнением полученных геномов с геномами ближайших родственников.
6. Из исследованных образцов криопэгов выделены две чистые культуры анаэробных бактерий, восстанавливающих сульфат при температурах *in situ*. На основании полученных физиолого-биохимических и генотипических характеристик показано, что сульфатредукторы являются представителями новых психроактивных видов рода *Desulfovibrio* – *D. arcticus* B15^T и ‘*D. gilichinskyi*’ K3S^T.

7. В составе микробных сообществ криопэгов обнаружены и охарактеризованы первые представители рода *Psychrobacter*, способные к росту в анаэробных условиях: предложен новый психротолерантный вид '*Psychrobacter muriicola*' с типовым видом 2pS^T. Штамм C7^T, выделенный из криопэга п-ва Ямал и представляющий новый вид *Celerinatantimonas yamalensis*, является первой diaзотрофной бактерией выделенной из экосистем Арктики.
8. Все бактерии, выделенные из криопэгов, были адаптированы к отрицательным температурам. Рост *C. algoriphilum* 14D1^T и '*P. muriicola*' 2pS^T при отрицательных температурах характеризовался повышением галотолерантности и расширением спектра используемых субстратов. При одновременном воздействии отрицательной температуры и солености в составе жирных кислот клеток "*P. muriicola*" 2pS^T появлялись метилированные производные насыщенных жирных кислот. *C. algoriphilum* 14D1^T накапливал внутриклеточный полисахарид, содержание которого в клетках зависело от температуры культивирования и солености среды.
9. Изучение влияния ультрафиолетового излучения, вакуума и наличия сильных окислителей (перхлоратов) показало, что штаммы исследованных видов метаногенов могут быть использованы в качестве моделей для астробиологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Абызов С.С., Бобин Н.Е., Кудряшов Б.Б.** Микробиологические исследования ледниковой толщи Центральной Антарктики. // Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1979. Т. 6. – С. 828.
2. **Баросс Д., Морита Р.** Жизнь микроорганизмов при низких температурах: экологические аспекты. В сборнике статей: Жизнь микробов в экстремальных условиях, под ред. Д. Кашнера. Пер. с англ. - Изд. «Мир», М., 1981.
3. **Бурашникова Е.Н., Гоготов И.Н.** Пурпурная несерная бактерия, выделенная из древней вечной мерзлоты на Колымской низменности// Микробиология. - 1994. - Т. 63 – С. 868-875.
4. **Вайнштейн М.Б., Гоготова Г.И., Хиппе Х.** Сульфатредуцирующая бактерия из вечной мерзлоты // Микробиология. - 1995. - Т. 64. - С. 514-518.
5. **Гавриш Е. Ю., Краузова В. И., Потехина Н.В. и др.** Три новых вида бревибактерий- *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. // Микробиология. 2004. - Т.73. - С. 218-225.
6. **Гиличинский Д.А., Хлебникова Г.М., Звягинцев Д.Г.** Микробиологические характеристики при изучении осадочных пород криолитозоны // Изв. АН СССР, Сер. геолог. - 1989. - № 6. - С. 103-115.
7. **Гиличинский Д.А., Ривкина Е.М., Щербакова В.А. и др.** Криопэги и их обитатели – модель для астробиологии // Криосфера Земли. - 2003. - Т. VII. -№ 3. - С. 73-84.
8. **Головченко Н.П., Чувильская Н.А., Акименко В.К.** Внутриклеточный полисахарид *Clostridium thermocellum* // Микробиология. - 1986. - Т.55. - № 3. - С.461-464.
9. **Голубев В.И.** *Rhodotorula creatinovora* и *R. yakutica*-новые виды базидиомицетных дрожжей, выделенных из вечномерзлых почв Восточной Сибири // Микология и Фитопатология. – 1998. - Т.32. - С. 8-13.
10. **Гулевский А.К., Релина Л.И.** Антифризные белки. Сообщение II. Распространение в природе// Проблемы криобиологии. - 2009. – Т. 19. - №2. – С.121-136.
11. **Демидов Н.Э., Гиличинский, Д.А., Миронов, В.А., Шмакова, Л.А.** Криобиосфера Земли и поиск жизни на Марсе // Криосфера Земли. – 2012. – Т. 16. – №4. – С. 67-82.

12. **Дмитриев В.В., Гиличинский Д.А., Фазутдинова Р.Н. и др.** Обнаружение жизнеспособных дрожжей в вечномёрзлых почвах Сибири возрастом 3 миллиона лет // Микробиология. - 1997. - Т. 66. - С. 655-660.
13. **Жилина Т. Н., Заварзин Г. А.** Микроплазма в культурах метаносарцины // Микробиология. – 1979. – Т. 48. – С. 558-560.
14. **Звягинцев Д. Г., Гиличинский Д.А., Благодатский С.А. и др.** Длительность сохранения микроорганизмов в постоянно мерзлых осадочных породах и погребенных почвах // Микробиология. – 1985. – Т. 54. – №. 1. – С. 155.
15. **Иванов М.В., Леин А.Ю.** Метанобразующие микроорганизмы компонент биосферы Марса. // ДАН СССР. – 1991. – Т.321. - №6. С. 1272-1276.
16. **Карасев С.Г., Гурина Л.В., Гавриш Е.Ю. и др.** Жизнеспособные актинобактерии из древних вечномёрзлых отложений Сибири // Криосфера Земли. - 1998. - Т.II. №.2. С. 69-75.
17. **Краев, Г.Н., Шульце, Э.Д., Ривкина, Е.М.** Криогенез как фактор распределения метана в горизонтах мерзлых пород // Докл РАН -. 2013. - Т. 451. - № 6. - С. 684-684.
18. **Кудряшова, Е.Б., Черноусова, Е.Ю., Сузина, Н.Е., Арискина, Е.В., Гиличинский, Д.А.** Микробное разнообразие образцов позднеплейстоценовых многолетнемерзлых пород Сибири. // Микробиология. – 2013. – Т. 82. №3. – С. 351-351.
19. **Кузьмин Н.П., Дуда В.И., Шершунов И.Н. и др.** Бациллы из древних слоев почв сибирской вечной мерзлоты. Труды международной конференции “Микробное разнообразие: текущая ситуация, стратегии сохранения и экологические аспекты”, 8-11 окт., 1996, Пермь. С. 191-192.
20. **Лях С.П.** Адаптация микроорганизмов к низким температурам. Изд. «Наука». М., 1976. 159 с.
21. **Новиков Ю.В., Ласточкина К.О., Болдина З.Н.** Методы исследования качества воды водоемов. Москва. Медицина. 1990. стр. 116-120.
22. **Петровская Л.Е., Новотоцкая-Власова К.А., Спирина Е.В. и др.** Липолитические ферменты микроорганизмов из криопэгов вечной мерзлоты. // Докл РАН. - 2012. - Т. 445. - №1. - С. 102-105.
23. **Печерицына С.А., Щербакова В.А., Холодов А.Л. и др.** Микробиологический анализ криопэгов Варандейского полуострова на побережье Баренцева моря. // Микробиология – 2007. – Т. 76. - №5. – С. 694-701.
24. **Печерицына С.А., Архипова О.В, Сузина Н.Е. и др.** Внутриклеточный полисахарид анаэробного психрофила *Clostridium algariphilum* // Микробиология. - 2011. Т 79. - №1. - С. 1-7.

37. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А. и др. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов. // Микробиология.- 2006. –Т. 75. №4. – С. 446-456.
38. **Abt B., Han C., Scheuner C., Lu M. et al.** Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccoides* type strain (SPN1^T), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccoides* comb. nov. and emendations of the family *Spirochaetaceae* and the genus *Sphaerochata* // Standards in Genomic Sciences. - 2012. - V. 6. – №2. - P. 194-209.
39. **Adamberg K., Kask S. Laht T.-M., Paalme T.** The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study // Int. J. Food Microbiol. - 2003. - V. 85. - P. 171–183.
40. **Aghajari N. Van Petegem F. Villeret V. Chessa J. P. Gerday et al.** Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold adapted proteases // Proteins. 2003. - V. 50. - P. 636–647.
41. **Allan J., Ronholm, J., Mykytczuk, N. C. S. et al.** Methanogen community composition and rates of methane consumption in Canadian High Arctic permafrost soils // Environmental microbiology reports. – 2014. – Т. 6. – №. 2. – С. 136-144.
42. **Altheide T.S., Kral T.A.** Low-Pressure Desiccation Effects On Methane Production By Methanogens. // Lunar and Planetary Science Conference. - 2008. - P. 3-4.
43. **Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiological Reviews. - 1995. - V. 59. - №1. - P. 143-169.
44. **Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B. et al.** Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III // Cryobiology.– 2004.– V. 48, №3.–P. 273–282.
45. **Annous B.A., Becker L.A., Bayles D.O., Labeda., D.P., Wilkinson B. J.** Critical role of anteiso-C(15:0) fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - V. 63. - P. 3887–3894.
46. **Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Weightman A.J.** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies // Appl Environ Microbiol. – 2005. – V. 71. – №12. – P. 7724-7736.
47. **Auguet J.-C., Barberan A., Casamayor E.O.** Global ecological patterns in uncultured Archaea // International Society for Microbial Ecology. – 2010. -V. 4. - №2. - P. 182.
48. **Ayala-del-Río H. L., Chain P. S., Grzymalski J. J. et al.** The genome sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a psychroactive Siberian permafrost bacterium, reveals

mechanisms for adaptation to low-temperature growth.// Appl Environ Microbiol. - 2010. – V. 76(7). – P. 2304-2312.

49. **Bai Y., Yang D., Wang J. et al.** Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan Mountains, northwestern China // Research in Microbiology. – 2006. – V. 157. – №8. – P. 741-751.

50. **Bakermans C. and Neelson K.H.** Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopegella* // J Bact. - 2004. - V. 186. - N. 8. - P. 2340–2345.

51. **Bakermans C., Tsapin A. I., Souza-Egipsy V., Gilichinsky D. A., Neelson K.** Reproduction and metabolism at – 10°C of bacteria isolated from Siberian permafrost // Environmental Microbiology. – 2003. – V. 5. – №4. – P. 321-326.

52. **Bakermans C., Ayala-del-Río H.L., Ponder M.A. et al.** *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost // Int J Syst Evol Microbiol. – 2006. – V. 56. – №6. – P. 1285-1291.

53. **Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R., Wolfe R.S.** Methanogens: reevaluation of a unique biological group // Microbiological Reviews. - 1979. –V. 43. - №2. - P. 260-296.

54. **Ballicora M.A., Inglesias, A.A. and Preiss J.** ADP Glucose Pyrophosphorylase, a Regulatory Enzyme for Bacterial Glycogen Synthesis // Microb. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67. № 2. - P. 213–225.

55. **Bar Dolev M., Braslavsky I., Davies P.L.** Ice-Binding Proteins and Their Function // Annu Rev Biochem. – 2016. - V. 2 (85). – P. 515-42.

56. **Barrett J.** Thermal hysteresis proteins // Int J Biochem Cell Biol. – 2001. – V.- 33, № 2. – P. 105–117.

57. **Bayles D.O., Annous B.A., Wilkinson B.J.** Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures // Appl Environ Microbiol. – 1996. – T. 62. – №. 3. – P. 1116-1119.

58. **Beam J.P., Jay Z.J., Kozubal M.A., Inskeep W.P.** Niche specialization of novel *Thaumarchaeota* to oxic and hypoxic acidic geothermal springs of Yellowstone National Park // International Society for Microbial Ecology. – 2014. -V. 8. - №4. - P. 938.

59. **Beam J.P., Jay Z.J., Schmid M.C. et al.** Ecophysiology of an uncultivated lineage of *Aigarchaeota* from an oxic, hot spring filamentous ‘streamer’ community // International Society for Microbial Ecology. – 2016. -V. 10. - №1. - P. 210.

60. **Becker W.M., Reece J.B., Poenie M.F.** The world of the cell. Redwood City. – 1996.

61. **Belay N., Boopathy R., Voskuilen G.** Anaerobic transformation of furfural by *Methanococcus deltae* Δ H // Appl Environ Microbiol. - 1997. -V. 63. - №5. - P. 2092-2094.
62. **Bell G.S. et al.** Stepwise adaptations of citrate synthase to survival at life's extremes. From psychrophile to hyperthermophile // Eur. J. Biochem. - 2002. - V.269. - P. 6250–6260.
63. **Berestovskaya J.J., Kotsyurbenko O.R., Tourova T.P. et al.** *Methylorosula polaris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic psychrotolerant bacterium from tundra wetland soil // Int J Syst Evol Microbiol. – 2012. – V. 62(3). - P.638-46.
64. **Berger F., Morellet N., Menu F., Potier P.** Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55 // J. Bacteriol. - 1996. - V. 178. - P. 2999–3007.
65. **Belova S.E., Suzina N.E., Rijkstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysch S.N.** *Edaphobacter lichenicola* sp. nov., a member of the family *Acidobacteriaceae* from lichen-dominated forested tundra.// Int J Syst Evol Microbiol. – 2018, doi:10.1099/ijsem.0.002663.
66. **Bhaganna P., Volkers R.J.M., Bell A.N.W. et al.** Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells // Microbial Biotechnology. - 2010. - V. 3. - №6. - P. 701-716.
67. **Bhakoo M. and Herbert A.** The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligately psychrophilic *Vibrio spp* // Arch. Microbiol. - 1979. - V.121. - P. 121-127.
68. **Biswas S. and Rolain J.M.** Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture // Journal of Microbiological Methods. - 2013. - V. 92. - №1. - P. 14-24.
69. **Blake, L. I., Tveit, A., Øvreås, L., Head, I. M., & Gray, N. D.** Response of methanogens in Arctic sediments to temperature and methanogenic substrate availability // PloS One. – 2015. – V. 10. – №6. – P. e0129733.
70. **Boone D.R.** Replacement of the Type Strain of *Methanobacterium formicicum* and Reinstatement of *Methanobacterium bryantii* sp. nov. nom. rev. (ex Balch and Wolfe, 1981) with M.o.H. (DSM 863) as the Type Strain // Int J Syst Evol Microbiol. - 1987. - V. 37. - №2. - P. 172-173.
71. **Boone D.R. and Whitman W.B.** Proposal of Minimal Standards for Describing New Taxa of Methanogenic Bacteria // Int J Syst Evol Microbiol. - 1988. - V. 38. - №2. - P. 212-219.
72. **Boone D. R., Whitman W. B., Rouvière P.** Diversity and taxonomy of methanogens // Methanogenesis. – Springer US, 1993. – P. 35-80.
73. **Boopathy R.** Transformation of nitroaromatic compounds by a methanogenic bacterium, *Methanococcus* sp. (strain B) // Archives of Microbiology. - 1994. -V. 162. - №3. - P. 167-172.

74. **Borrel G., Colombet J., Robin A. et al.** Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat // *International Society for Microbial Ecology*. - 2012. - V.6. - №11. - P. 2119-2127.
75. **Borrel G., Adam P.S., Gribaldo S.** Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association // *Genome Biology and Evolution*. - 2016. - V. 8. - №6. - P. 1706-1711.
76. **Boston P.J., Ivanov M.V., P. McKay C.** On the possibility of chemosynthetic ecosystems in subsurface habitats on Mars // *Icarus*. - 1992. - V. 95. - №2. - P. 300-308.
77. **Bowman, J. P. and McMeekin, T. A.** Order X. *Alteromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol.2 (The Proteobacteria), part B (The *Gammaproteobacteria*), p. 443. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Stanley & G. M. Garrity. New York: Springer, 2005
78. **Bowman J.P., Nichols S.S. and McMeekin T.A.** *Psychrobacter glacincola* sp.nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice // *System. Appl. Microbiol.* 1997. V. 20. P. 209-215.
79. **Boyd W.L. and Boyd J.W.** The presence of bacteria in permafrost of the Alaskan Arctic // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1964. – V. 10. – №6. – P. 917-919.
80. **Boynton W.V.** Distribution of Hydrogen in the Near Surface of Mars: Evidence for Subsurface Ice Deposits // *Science*. - 2002. - V. 297. - №5578. - P. 81-85.
81. **Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – №1-2. – P. 248-254.
82. **Brambilla E., Hippe H., Hagelstein A., Tindall B. J., Stackebrandt E.** 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica // *Extremophiles*. – 2001. – T. 5. – №. 1. – C. 23-33.
83. **Bräuer S.L., Cadillo-Quiroz H., Yashiro E., Yavitt J.B., Zinder S.H.** Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog // *Nature*. - 2006. - V. 442. - №7099. - P. 192-194.
84. **Brenner D. J., Staley J. T., Krieg N. R.** Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – Springer, Boston, MA, 2005. – C. 27-32.
85. **Brioukhanov A. L., Netrusov A. I., Eggen R. I. L.** The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri* // *Microbiology*. – 2006. – T. 152. – №. 6. – C. 1671-1677.

86. **Brochier-Armanet C., Forterre P., Gribaldo S.** Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later // *Current Opinion in Microbiology*. - 2011. -V. 14. - №3. - P. 274-281.
87. **Brochier-Armanet C.I., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P.** Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota* // *Nature Reviews Microbiology*. - 2008. -V. 6. - №3. - P. 245-252.
88. **Brown J., Masuchi Y., Robb F., Doolittle W.** Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes // *Journal of Molecular Evolution*. - 1994. -V. 38. - №6. - P. 566-576.
89. **Buck J.D.** Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1982. – V. 44. – №4. – P. 992-993.
90. **Buckland P.C.** The early dispersal on insect pests of stored products as indicated by archaeological records // *J. Stored Prod. Res.* – 1981.– V. 17, №1.– P. 1–12.
91. **Cameron R. E. and Morelli F. A.** Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor Valley drill core // *Antarctic Journal of the United States*. – 1974. – P. 9. – №4. – P. 113-116.
92. **Capone D.G., Bronk D.A., Mulholland M.R., Carpenter E.J.** Nitrogen in the Marine Environment. 2008. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier.
93. **Carr M.H.** The surface of Mars. 2006. Cambridge Univ Pr. 307 pp.
94. **Caro-Quintero A., Ritalahti K.M., Cusick K.D., Löffler F.E., Konstantinidis K.T.** The chimeric genome of sphaerochaeta: Nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology // *mBio*. - 2012. - V.3. - №3. - P. e00025-12.
95. **Casanueva A., Tuffin M., Cary C., and Cowan D.A.** Molecular adaptations to psychrophily: the impact of ‘omic’ technologies // *Trends in microbiology*. - 2010. – V. 18(8). – P. 374-381.
96. **Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C. et al.** Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // *Current Biology*. - 2015. -V. 25. - №6. - P. 690-701.
97. **Cavicchioli R.** On the concept of a psychrophile // *The ISME journal*. - 2016. – V. 10(4). - P. 793.
98. **Cavicchioli R.** Cold adapted Archaea // *Nat Rev Microbiol*. - 2006. – V. 4. – P. 331–343.
99. **Chan M., Virmani Y. P., Himes R. H., Akagi J. M.** Spin-labeling studies on the membrane of a facultative thermophilic bacillus // *J Bacteriol*. – 1973. – T. 113. – №. 1. – C. 322-328.

100. **Chao A.** Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability // *Biometrics*. – 1987. – P. 783-791.
101. **Chastain B.K., Kral T.A.** Zero-valent iron on Mars: An alternative energy source for methanogens // *Icarus*. - 2010. - V. 208. - №1. - P. 198-201.
102. **Chatton E.** Titres et travaux scientifiques (1906-1937) de Edouard Chatton. In: Impr. E. Sottano, 1937.
103. **Chattopadhyay M.K., Jagannadham M.V., Vairamani M. and Shivaji S.** Carotenoid pigments of an antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure and interaction with synthetic membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1997. - V. 239. - P. 85-90.
104. **Chen J., Wang F., Zheng Y., Jiang L., Xiao X.** Investigation of the methanogen-related archaeal population structure in shallow sediments of the Pearl River Estuary, Southern China // *Journal of Basic Microbiology*. - 2014. - V. 54. - №6. - P. 482-490.
105. **Chen Z., Yu H., Li L., Hu S., & Dong X.** The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanobus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics // *Environ Microbiol Reports*. – 2012. – V. 4. – №6. – P. 633-641.
106. **Chen L., DeVries A.L., Cheng C.H.** Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – V. 94, №8. – P. 3817–3822.
107. **Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H.** Antifreeze Proteins from Diverse Organisms and their Applications: An Overview. // *Curr Protein Pept Sci*. – 2017. – V. 18(3). P. 262-283.
108. **Chintalapati S., Kiran M.D and Shivaji S.** Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation // *Cell. Mol. Biol.* - 2004. - V. 50. - P. 631–642.
109. **Choma C., Clavel T., Dominguez H.et al.** Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415 // *Int. J. Food Microbiol.* - 2000. - V. 55. - P. 73–77.
110. **Chong S.C., Liu Y., Cummins M., Valentine D.L., Boone D.R.** *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2002. – V. 81. – №1. – P. 263-270.
111. **Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G., Reeve, J. N.** Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice // *Environ Microbiol*. – 2001. – T. 3. – №. 9. – C. 570-577.
112. **Cline J. D.** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // *Limnol. Oceanogr.* - 1969. - V.14. - P. 444-458.

113. **Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., and Antoun H.** Heat and cold shock protein synthesis in Arctic and temperate strains of *Rhizobia* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1992. - V. 58. - P. 2846–2853.
114. **Cole J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B. et al.** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis // *Nucleic Acids Research.* – 2013. – V. 42. – №D1. – P. D633-D642.
115. **Collins M. D., Lawson P. A., Willems A. et al.** The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1994. – V. 44. - P. 812–826.
116. **Collins M.D., Rodrigues U.M., Dainty R.H., Edwards R.A., Roberts T.A.** Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov // *FEMS microbiology letters.* – 1992. – T. 96. – №. 2-3. – C. 235-239.
117. **Collins M. D.** Analysis of isoprenoid quinones. *In: Methods in Microbiology*, vol. 18, pp. 329–366. Edited by G. Gottschalk. New York: Academic Press. 1985.
118. **Collins T., Meuwis M.A., Gerday C. and Feller G.** Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments // *J. Mol. Biol.* - 2003. - V. 328. - P. 419–428.
119. **Colwell F.S., Boyd S., Delwiche M.E. et al.** Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin // *Appl Environ Microbiol.* - 2008. -V.74. - №11. - P. 3444-3452.
120. **Costa K.C., Leigh J.A.** Metabolic versatility in methanogens // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2014. – V. 29. – P. 70-75.
121. **Cowan D.A., Russell N., Mamais A., Sheppard D.M.** Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass // *Extremophiles.* - 2002. - V. 6. - №5. - P. 431–436.
122. **Cramer M.J., Haghshenas N., Bagwell C.E., Matsui G.Y. Lovell, C.R.** *Celerinatantimonas diazotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium representing a new family in the Gammaproteobacteria, *Celerinatantimonadaceae* fam. nov. // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2011. – V. 61. – P. 1053–1060.
123. **Cray J.A., Stevenson A., Ball P. et al.** Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms // *Current Opinion in Biotechnology.* - 2015. - V. 33. - P. 228-259.
124. **Cui M., Ma A., Qi H., Zhuang X., Zhuang G.** Anaerobic oxidation of methane: an "active" microbial process // *MicrobiologyOpen.* - 2015. - V.4. - №1. - P. 1-11.

125. **Cull S.C., Arvidson R.E., Catalano J.G. et al.** Concentrated perchlorate at the Mars Phoenix landing site: Evidence for thin film liquid water on Mars // *Geophysical Research Letters*. - 2010. - V. 37. - P. 1-6.
126. **D'Amico S., Marx J.C., Gerday C., Feller G.** Activity–stability relationships in extremophilic enzymes // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 7891–7896.
127. **De E., Orange N., Saint N. et al.** Growth temperature dependence of channel size of the major outer membrane protein (Oprf) in psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* strains // *Microbiology*. - 2007. - V. 143. - P. 1029–1035
128. **De Maayer P., Anderson D., Cary C., & Cowan D.A.** Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles.// *EMBO Reports*. - 2014. – V. 15(5). – P. 508–517.
129. **Dedysh S.N., Didriksen A., Danilova O.V. et al.** *Methylocapsa palsarum* sp. nov., a methanotroph isolated from a subarctic discontinuous permafrost ecosystem.// *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2015. V. 65(10). –P. 3618-24.
130. **Demidov N.E., Boynton W.V., Gilichinsky D.A. et al.** Water distribution in Martian permafrost regions from joint analysis of HEND (Mars Odyssey) and MOLA (Mars Global Surveyor) data // *Astronomy Letters*. - 2008. - V. 34. - №10. - P. 713-723.
131. **DeVries, A.L. and Wohlschlag, D.E.** Freezing resistance in some Antarctic fishes// *Science*. - 1969. – V.163, №3871. – P.1073–1075.
132. **Di Giulio M.** Formal proof that the split genes of tRNAs of *Nanoarchaeum equitans* are an ancestral character // *Journal of Molecular Evolution*. – 2009. – V. 69. – №5. – P. 505.
133. **Ding X., Yang W.J., Min H. et al.** Isolation and characterization of a new strain of *Methanothermobacter marburgensis* DX01 from hot springs in China // *Anaerobe*. - 2010. - V. 16. - №1. - P. 54-59.
134. **Droge S., Frohlich J., Radek R., Konig H.** *Spirochaeta coccodes* sp. nov., a Novel Coccoid Spirochete from the Hindgut of the Termite *Neotermes castaneus* // *Appl Environ Microbiol*. - 2006. - V. 72. - №1. - P. 392-397.
135. **Duman J.G. and Olsen T.M.** Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants // *Cryobiology*. - 1993. - V. 30. - P. 322–328.
136. **Edgcomb M.R., Sirimanne S., Wilkinson B.J., Drouin P., and Morse R.D.** Electron paramagnetic resonance studies of the membrane fluidity of the foodborne pathogenic psychrotroph *Listeria monocytogenes* // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2000. - V. 1463. - P. 31–42.
137. **Elkins J.G., Podar M., Graham D.E. et al.** A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2008. - V. 105. - №23. - P. 8102-8107.

138. **Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L. et al.** Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // *Science*. - 2015. - V. 350. - №6259. - P. 434-438.
139. **Ewart K.V., Li Z., Yang D.S. et al.** The ice-binding site of Atlantic herring antifreeze protein corresponds to the carbohydrate-binding site of C-type lectins // *Biochemistry*. - 1998. - V. 37, №12. - P. 4080-4085.
140. **Farewell A., and Neidhardt F.C.** Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* - 1998. - V. 180. - P. 4704-4710.
141. **Farrell J., and Rose A.H.** Temperature effects on microorganisms. In A. H. Rose (ed.), *Thermobiology*. Academic Press, Inc., Ltd., London, United Kingdom. 1967. p. 147-218.
142. **Feller G. and Gerday C.** Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // *Nat Rev Microbiol.* - 2003. - V. 1. - N. 3. - P. 200-208.
143. **Feller G., Narinx E., Arpigny J. L. et al.** Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic antarctic bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1994. - V. 41. - P. 477-479.
144. **Feller G.** Protein folding at extreme temperatures: Current issues. *Semin Cell Dev Biol.* - 2017. - V. 25. pii: S1084-9521.
145. **Ferry J. G.** Fermentation of acetate // *Methanogenesis*. - Springer US, 1993. - P. 304-334.
146. **Ferry J.G.** The chemical biology of methanogenesis // *Planetary and Space Science*. - 2010. - V. 58. - №14. - P. 1775-1783.
147. **Fields P.A. and Somero G.N.** Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. - 1998. - V. 95. - P. 11476-11481.
148. **Fischer E., Martínez G.M., Elliott H.M., Rennó N.O.** Experimental evidence for the formation of liquid saline water on Mars // *Geophys Research Letters*. - 2014. - V. 41. - №13. - P. 4456-4462.
149. **Fondi M. et al.** Draft genomes of three Antarctic Psychrobacter strains producing antimicrobial compounds against Burkholderia cepacia complex, opportunistic human pathogens // *Marine genomics*. - 2014. - T. 13. - C. 37-38.
150. **Formisano V.** Detection of Methane in the Atmosphere of Mars // *Science*. - 2004. - V. 306. - №5702. - P. 1758-1761.
151. **Franzmann P.D., Springer N., Ludwig W., Conway De Macario E., Rohde M.** A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. // *Syst. Appl Microbiol.* - 1992. - V. 15. - №4. - P. 573-581.

152. **Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L. et al.** *Methanogenium frigidum* sp. nov., a Psychrophilic, H₂-Using Methanogen from Ace Lake, Antarctica // *Analysis*. - 1997. - V. 47. - №4. - P. 1068-1072.
153. **French H.** *The Periglacial Environment*, 2nd edn. Addison Wesley Longman: Harlow, UK; 340, 1996.
154. **Friedrich M.W.** Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea // *Methods in Enzymology*. - 2005. - V. 397. - P. 428-442.
155. **Ganzert L., Jurgens G., Münster U., Wagner D.** Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2007. - V. 59. - №2. - P. 476-488.
156. **Garcia J.-L., Patel B.K.C., Ollivier B.** Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea // *Anaerobe*. - 2000. - V. 6. - №4. - P. 205-226.
157. **Garrity G.M., Bell J.A., & Lilburn T.G.** Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*. 2004.
158. **Garnham, C.P., Gilbert, J.A., Hartman, C.P. et al.** A Ca²⁺-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel betahelical ice-binding fold // *Biochem. J.* – 2008.– V. 411, №1.– P. 171–180.
159. **Ge L, Zhao Q, Sheng H, Wu J, An L.** *Epilithonimonas psychrotolerans* sp. nov., isolated from alpine permafrost // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2015. – V. 65(11). – P. 3777-3781.
160. **Gianese G., Argos P., Pascarella S.** Structural adaptation of enzymes to low temperatures // *Protein engineering*. – 2001. – T. 14. – №. 3. – C. 141-148.
161. **Gianese G., Bossa F. and Pascarella S.** Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes // *Proteins*. - 2002. - V. 47. - P. 236–249.
162. **Gilbert J.A., Hill P.J., Dodd C.E.R., and Laybourn-Parry J.** Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria // *Microbiology*. - 2004. - V. 150. - P. 171-180.
163. **Gilbert J.A., Davies P.L., Laybourn-Parry J.** A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – V. 245. - №1.– P. 67–72.
164. **Gilichinsky D., Wagener S., Vishnevetskaya T.** Permafrost microbiology // *Permafrost and Periglacial Processes*. - 1995. - V. 6. - №4. - P. 281-291.
165. **Gilichinsky D.A.** Permafrost as a microbial habitat: extreme for the Earth, favorable in Space // *Instruments, Methods, and Missions for the Investigation of Extraterrestrial Microorganisms*. – 1997. – V. 3111.

166. **Gilichinsky D.** Permafrost. *In: Encyclopedia of environmental microbiology* Bitton G. Wiley, New York, 2002. - P. 2367–2385.
167. **Gilichinsky D., Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichuis K., Tiedje J.** Supercooled water brines within permafrost - an unknown ecological niche for microorganisms: A model for astrobiology // *Astrobiology*. - 2003. - V. 3. - №2. - P. 331-341.
168. **Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V. et al.** Biodiversity of cryopegs in permafrost // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2005. -V. 53. - №1. - P. 117-128.
169. **Gilichinsky D.A., Wilson G.S., Friedmann E.I. et al.** Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology // *Astrobiology*. - 2007. - V. 7. - P. 275-311.
170. **Gilichinsky D., Vishnivetskaya T., Petrova M. et al.** Bacteria in Permafrost / *In: Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C. Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008. – P. 83.
171. **Gilichinsky D. and Rivkina E.** Permafrost Microbiology // *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands, 2011. - P. 726-732.
172. **Gogarten J.P., Kibak H., Dittrich P. et al.** Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes // *Proc Natl Acad Sci USA*. -1989. - V. 86. - №17. - P. 6661-6665.
173. **Good I. J.** The population frequencies of species and the estimation of population parameters // *Biometrika*. – 1953. – V. 40. – №3-4. – P. 237-264.
174. **Gounot A. M.** Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 1986. – V. 42. – №11. – P. 1192-1197.
175. **Gounot, A. M., and N. J. Russell.** Physiology of cold-adapted microorganisms *In: R. Margesin and F. Schinner (Ed.) Cold-adapted Organisms: Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology*. Berlin, Germany. 1999, P. 33–55.
176. **Graham DE, Wallenstein MD, Vishnivetskaya TA et al.** Microbes in thawing permafrost: the unknown variable in the climate change equation // *ISME J*. – 2012. – V. 6. – P. 709-12.
177. **Guillou, C., and J. F. Guespin-Michel.** Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MF0 // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1996. - V. 62. - P. 3319–3324.
178. **Gupta R.S.** Protein phylogenies and signature sequences: evolutionary relationships within prokaryotes and between prokaryotes and eukaryotes // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 1997. - V. 72. - №1. - P. 49-61.

179. **Gupta R.S.** Life's Third Domain (Archaea): An Established Fact or an Endangered Paradigm?: A New Proposal for Classification of Organisms Based on Protein Sequences and Cell Structure // *Theoretical Population Biology*. - 1998. - V. 54. - №2. - P. 91-104.
180. **Guy L., Ettema T.J.** The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes // *Trends in Microbiology*. 2011. - V. 19. - №12. - P. 580-587.
181. **Gyeong H.R., Baek K., Hwang C.Y. et al.** *Domibacillus tundrae* sp. nov., isolated from active layer soil of tussock tundra in Alaska, and emended description of the genus *Domibacillus* // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2015. – V. 65(10). P. 3407-12.
182. **Hales B.A., Edwards C., Ritchie D.A., Hall G., Pickup R.W., Saunders J.R.** Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis // *Appl Environ Microbiol*. - 1996. - V. 62. – №2. - P. 668–675.
183. **Haroon M.F., Hu S., Shi Y. et al.** Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // *Nature*. - 2013. - V. 500. - №7464. - P. 567-570.
184. **Harder W. and Veldkamp H.** Physiology of an obligately psychrophilic marine *Pseudomonas* species // *J. Appl. Bacteriol*. - 1968. - V. 31. - P. 12–23.
185. **Hasegawa Y., Kawada N. and Nosho Y.** Change in chemical composition of membrane of *Bacillus caldotenax* after shifting the growth temperature // *Arch. Microbiol*. - 1980. - V. 126. - P. 103-108.
186. **Hazel J.R.** Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? // *Annu. Rev. Physiol*. - 1995. - V. 57. - P. 19-42.
187. **He Y., Li M., Perumal V. et al.** Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum *Bathyarchaeota* widespread in marine sediments // *Nature Microbiology*. – 2016. - V. 1. - P. 16035.
188. **Hebraud M. and Potier P.** Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria // *J. Mol. Biotechnol*. - 1999. - V.1. - N.2.- P.211-219.
189. **Hébraud M., Dubois E., Potier P., and Labadie J.** Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi* // *J. Bacteriol*. - 1994. - V. 176. - P. 4017–4024.
190. **Hecht M.H., Kounaves S.P., Quinn R.C. et al.** Detection of perchlorate and the soluble chemistry of martian soil at the Phoenix lander site // *Science (New York, NY)*. -2009. - V. 325. - №5936. - P. 64-7.
191. **Hedderich R., Whitman W. B.** Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea // *The Prokaryotes*. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 635-662.

192. **Hedlund B.P., Murugapiran S.K., Alba T.W. et al.** Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota' // *Current Opinion in Microbiology*. - 2015. -V. 25. - P. 136-145.
193. **Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.** Real Time Quantitative PCR // *Genome Research*. - 1996. -V. 6. – №10. - P. 986-994.
194. **Herbert D., Phipps P.J. and Strange R.E.** Chemical Analysis of Microbial Cells // In *Methods of Microbiology*. N.Y.-L.: Acad.Press. 1971. V 5B.P.209.
195. **Herbert R.A.** (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems.// *FEMS Microbiol Rev.* – 1999. – V. 23. - P. 563–590.
196. **Heuchert A., Gluckner F.O., Amann R. and Fischer U.** *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the south Atlantic (Antarctica) // *Syst. Appl. Microbiol.* - 2004. - V. 27. - P. 399-406.
197. **Hippe, H., Andreesen J.R., and Gottschalk G.** The Genus *Clostridium*–nonmedical. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W., Harder, and K.-H. Schleifer (Eds.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York. 1992. P. 1800–1866.
198. **Hitchcock D.R. and Lovelock J.E.** Life detection by atmospheric analysis // *Icarus*. - 1967. -V. 7. - №1-3. - P.149-159.
199. **Hohorst H.J.** Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD⁺ // In *Methods of enzymatic Analysis*. Edited by H. Y. Bergmeyer. Weinheim: Verlag Chemie. 1970. P. 1425.
200. **Høj L., Olsen R.A., Torsvik V.L.** Archaeal communities in High Arctic wetlands at Spitsbergen, Norway as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2005. – V. 53. – №1. - P. 89-102.
201. **Hoehler T.M., Jørgensen B.B.** Microbial life under extreme energy limitation // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – T. 11. – №. 2. – C. 83.
202. **Hoshino T., Kiriaki M., Ohgiya S. et al.** Antifreeze proteins from snow mold fungi // *Can J Bot.* – 2003. - V. 81. – P. 1175–1181.
203. **Hoshino T., Kiriaki M, Nakajima T.** Novel thermal hysteresis proteins from low temperature basidiomycete, *Coprinus psychromorbidus* // *Cryo Letters*. – 2003. - V.24, №3. – P.135-142.
204. **Huang T., and Duman J.G.** Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* // *Plant. Mol. Biol.* – 2002. – V.48, №4. – P. 339–350.
205. **Huang Y., Wei Z., Danzeng W. et al.** *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2017. – V. 67(10). P. 4064-4068.

206. **Huang T., Nicodemus J., Zarka D.G. et al.** Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature // Plant Mol. Biol. – 2002. – V. 50. - №3. – P. 333–344.
207. **Iino T., Tamaki H., Tamazawa S. et al.** *Candidatus* Methanogranum caenicola: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata* // Microbes and Environments. - 2013. - V. 28. - №2. - P. 244-250.
208. **Isaksen M.F. and Jorgensen B.B.** Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments // Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - V. 62. – P. 408–414.
209. **Ivanova E. P., Flavier S. & Christen R.** Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2004. – V. 54. - P. 1773–1788.
210. **Iwabe N., Kuma K.-i., Hasegawa M., Osawa S., Miyata T.** Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes // Proc Natl Acad Sci USA. - 1989. - V. 86. - №23. - P. 9355-9359.
211. **Jagannadham M.V., Chattopadhyay M.K. and Shivaji S.** The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: fluorescence properties of the pigment and its binding to membranes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. - V. 220. - P. 724-728.
212. **Jagannadham M.V., Chattopadhyay M.K., Subbalakshmi C. et al.** Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum* // Arch. Microbiol. - 2000. - V. 173. - P. 418-424.
213. **Jagannadham M.V., Rao V.J. and Shivaji S.** The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: purification, structure and interaction with synthetic membranes // J. Bacteriol. - 1991. - V. 173. - P. 7911-7917.
214. **James N. and Sutherland M. L.** Are there living bacteria in permanently frozen subsoil? // Can J Res. – 1942. – V. 20. – №4. – P. 228-235.
215. **Jansson J.K. and Taş N.** The microbial ecology of permafrost // Nature Reviews Microbiology. - 2014. - V. 12. - №6. - P. 414-425.
216. **Jeanthon C., Nercessian O., Corre E., Grabowski-Lux A.** Hyperthermophilic and methanogenic archaea in oil fields // Petroleum Microbiology. – American Society of Microbiology, 2005. – P. 55-69.

217. **Jensen B.B.** Methanogenesis in monogastric animals //Environmental Monitoring and Assessment. – 1996. – V. 42. – №1. – P. 99-112.
218. **Jiang F., Dai J., Wang Y. et al.** *Cohnella arctica* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2012. - V. 62. - № 4. - P. 817-821.
219. **Jiang F., Dai J., Wang Y. et al.** *Mucilaginibacter soli* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2012. - V. 62(7). – P. 1630-5.
220. **Jiang F., Li W., Xiao M. et al.** *Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter* // Int J Syst Evol Microbiol. – 2012. V. 62(9). - P. 2259-63.
221. **Jiang F., Xiao M., Chen L. et al.** *Huanghella arctica* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Cytophagaceae* isolated from Arctic tundra soil // Int J Syst Evol Microbiol. – 2013. – V. 63(2). – P. 696-702.
222. **Jiang F., Qiu X., Chang X. et al.** *Terrimonas arctica* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2014. – V.64(11). – P. 3798-803.
223. **Jiang F., Danzeng W., Zhang Y. et al.** *Hymenobacter rubripertinctus* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2018. - V.68. - №2 - P. 663-668.
224. **Johnson S.S., Hebsgaard M.B., Christensen T.R. et al.** Ancient bacteria show evidence of DNA repair // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – V. 104. – №36. – P. 14401-14405.
225. **Jones C.E., Shama G., Jones D., Roberts I.S., and Andrew P.W.** Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes* // J. Appl. Microbiol. 1997. V. 83. P. 31–35.
226. **Jorgensen S.L., Hannisdal B., Lanzén A. et al.** Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge // Proc Natl Acad Sci USA. – 2012. - V. 109. - №42. - P. E2846-E2855.
227. **Jørgensen B. B.** Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction // Nature. – 1982. – T. 296. – №. 5858. – C. 643-645.
228. **Hungate R. E.** Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // Methods in Microbiology. – 1969. – V. 3. – P. 117-132.
229. **Kallmeyer J. et al.** Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment // Proc Natl Acad Sci USA. – 2012. – T. 109. – №. 40. – C. 16213-16216.
230. **Kandler O. and König H.** Cell envelopes of archaea: structure and chemistry // New Comprehensive Biochemistry. - 1993. - V. 26. - P. 223-259.
231. **Katayama T., Tanaka M., Moriizumi J. et al.** Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25,000 years // Appl Environ Microbiol. – 2007. – V. 73. – №7. – P. 2360-2363.

232. **Kawahara H., Li J., Griffith M. and Glick B. R.** Relationship between antifreeze protein and freezing resistance in *Pseudomonas putida* GR12-2 // *Curr Microbiol.* 2001. V. 43. P. 365–370.
233. **Kawahara H., Iwanaka Y., Higa S. et al.** A novel, intracellular antifreeze protein in an antarctic bacterium, *Flavobacterium xanthum*// *Cryo Letters.* – 2007. - V.28. - P.39-49.
234. **Kendall M.M., Boone D.R.** Cultivation of methanogens from shallow marine sediments at Hydrate Ridge, Oregon // *Archaea.* – 2006. – V. 2. – №1. – P. 31-38.
235. **Kendall M.M., Wardlaw G.D., Tang C.F., Bonin A.S., Liu Y., Valentine D.L.** Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. // *Appl Environ Microbiol.* - 2007. - V.73. - №2. - P. 407-414.
236. **Kendrick M.G., Kral T.A.** Survival of methanogens during desiccation: implications for life on Mars // *Astrobiology.* - 2006. -V. 6. - №4. - P. 546-551.
237. **Kenward K.D., Altschuler M., Hilderbrand D. et al.** Accumulation of type 1 fish antifreeze protein in transgenic tobacco is cold-specific // *Plant. Mol. Biol.*– 1993.– V. 23, №2.– P. 377–385.
238. **Kern T., Linge M., Rother M.** *Methanobacterium aggregans* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogenic archaeon isolated from an anaerobic digester // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2015. – V. 65. – №6. – P. 1975-1980.
239. **Khvorostyanov D.V. et al.** Vulnerability of permafrost carbon to global warming. Part I: model description and role of heat generated by organic matter decomposition // *Tellus B.* – 2008. – T. 60. – №. 2. – C. 250-264.
240. **Kim M., Pak S., Rim S. et al.** *Luteolibacter arcticus* sp. nov., isolated from high Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter* // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2015. – V. 65. №6. – P.1922-8.
241. Kim MC, Rim S, Pak S, Ren L, Zhang Y, Chang X, Li X, Fang C, Zheng C, Peng F. *Roseomonas arcticisoli* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – V. 66. - №10 - P. 4057-4064.
242. **Kitamura K., Fujita T., Akada S., Tonouchi A.** *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2011. -V. 61. - P. 1246-1252.
243. **Knoblauch C. and B.B. Jorgensen.** Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments // *Environ Microbiol.* - 1999. - V. 1. - N. 5. - P. 457-67.

244. **Knoblauch C., Jorgensen B. B., Harder J.** Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in Arctic marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. **65.** - P. 4230–4233.
245. **Knoblauch C., Sahn K., Jørgensen B.B.** Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 1999. – T. 49. – №. 4. – C. 1631-1643.
246. **Kobabe S., Wagner D., Pfeiffer E.M.** Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridisation // *FEMS Microbiology and Ecology.* - 2004. - V. 50. - P. 13-23.
247. **Koch K., Knoblauch C., Wagner D.** Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea // *Environmental Microbiology.* – 2009. – V. 11. – №3. – P. 657-668.
248. **Kondakova A.N., Novototskaya-Vlasova K.A., Drutskaya M.S. et al.** Structure of the O-polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Psychrobacter muricolla* 2pS^T isolated from overcooled water brines within permafrost // *Carbohydrate Research.* - 2012. V.349. - P 78-81.
249. **Kondakova A.N., Novototskaya-Vlasova K.A., Shashkov A.S. et al.** Structure of an acidic polysaccharide isolated from *Psychrobacter maritimus* 3pS containing bacillosamine derivative // *Carbohydrate Research.* - 2012. - V.359. - P 7-10.
250. **Kondakova A., Novototskaya-Vlasova K., Arbatsky N. et al.** Structure of the O specific Polysaccharide from the Lipopolysaccharide of *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T Containing a Newly Identified Amino Sugar, 2,3,4 Triacetamido-2,3,4 trideoxy-L arabinose // *Journal of Natural Products.* - 2012. - V. 75. - P. 2236-2240.
251. **Koonin E.V., Mushegian A.R., Galperin M.Y., Walker D.R.** Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea // *Molecular Microbiology.* - 1997. - V. 25. - №4. - P. 619-637.
252. **Kotelnikova S., Macario A.J.L., Pedersen K.** *Methanobacterium subterraneurn* // *Int J Syst Bacteriol.* - 1998. - V. 48. - P. 357-367.
253. **Kotsyurbenko O., Simankova M., Nozhevnikova A. et al.** New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov // *Archives of Microbiology.* - 1995. - V. 163. - №1. - P. 29-34.

254. **Kotsyurbenko O.R., Nozhevnikova A.N., Soloviova T.I., Zavarzin G.A.** Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 1996. - V. 69. - P. 75-86.
255. **Kotsyurbenko O.R., Chin K.J., Glagolev M.V. et al.** Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog // *Environmental Microbiology*. - 2004. -V. 6. - P. 1159-1173.
256. **Koven CD, Ringeval B, Friedlingstein P et al.** Permafrost carbon-climate feedbacks accelerate global warming // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – V. 108. – P. 14769-74.
257. **Kozubal M.A., Macur R.E., Jay Z.J. et al.** Microbial iron cycling in acidic geothermal springs of Yellowstone National Park: integrating molecular surveys, geochemical processes, and isolation of novel Fe-active microorganisms // *Frontiers in Microbiology*. - 2012. -V. 3.
258. **Kozubal M.A., Romine M., deM Jennings R. et al.** *Geoarchaeota*: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park // *International Society for Microbial Ecology*. – 2013. - V. 7. - №3. - P. 622.
259. **Krader P., Emerson D.** Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry // *Extremophiles*. - 2004. - V. 8. - №4. - P. 259-268.
260. **Kraev G.N., Schultze E.-D., Rivkina E.M.** Cryogenesis as a factor of methane distribution in layers of permafrost // *Dokl Earth Sciences*. - 2013. -V. 451. - №2. - P. 882-885.
261. **Kral T.A., Altheide, T.S., Lueders, A.E., Schuerger, A.C.** Low pressure and desiccation effects on methanogens: implications for life on Mars // *Planetary and Space Science*. – 2011. – V. 59. – №2. – P. 264-270.
262. **Krasnopolsky V.A., Maillard J.P., Owen T.C.** Detection of methane in the martian atmosphere: Evidence for life? // *Icarus*. - 2004. - V. 172. - №2. - P. 537-547.
263. **Krivushin K., Kondrashov F., Shmakova L. et al.** Two Metagenomes from Late Pleistocene Northeast Siberian Permafrost // *Genome Announcements*. - 2015. - V. 3. - №1. - P. 01380-14.
264. **Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M.** *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2010. - V. 60. - №2. - P. 455-459.
265. **Kropinski, A.M.B., Lewis, V. and Berry, D.** Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO // *J. Bacteriol*. 1987. V. 169. P. 1960-1966.

266. **Kubo K., Lloyd K.G., Biddle J.F., Amann R., Teske A., Knittel K.** Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments // International Society for Microbial Ecology. – 2012. - V. 6. - №10. - P. 1949.
267. **Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Suzina N.E. et al.** *Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and proposal of *Isosphaeraceae* fam. nov. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2016. - V. 66. №2. – P. 837-844.
268. **Huang Y, Wei Z, Danzeng W. et al.** *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil // Int J Syst Evol Microbiol. – 2017. - V.67. - №10. – P. 4064-4068.
269. **Lane D.J.** 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. – New York: John Wiley and Sons, 1991. – P. 125-175.
270. **Lauro F.M., DeMaere MZ, Yau S, Brown M, Ng C, Wilkins D et al.** An integrative study of a meromictic lake ecosystem in Antarctica // ISME. - 2011. - J 5. P. 879–895.
271. **Lazar C.S., Baker B.J., Seitz K. et al.** Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathyarchaeota* in estuarine sediments // Environmental Microbiology. – 2016. - V.18. - №4. - P. 1200-1211.
272. **Leadbetter J.R., Breznak J.A.** Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* // Appl Environ Microbiol. – 1996. – V. 62. – №10. – P. 3620-3631.
273. **Leaver M., Domínguez-Cuevas P., Coxhead J.M., Daniel R.A., Errington J.** Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis* // Nature. - 2009. - V. 460. - №7231. - P. 538-538.
274. **Leiros, H. K., Willassen, N. P. and Smalås, A. O.** Residue determinants and sequence analysis of cold-adapted trypsins // Extremophiles. 1999. V. 3. P. 205–219.
275. **Li W., Godzik A.** Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences // Bioinformatics. – 2006. – V. 22. – №13. – P. 1658-1659.
276. **Liebensteiner M.G., Pinkse M.W.H., Schaap P.J., Stams A.J.M., Lomans B.P.** Archaeal (Per)Chlorate Reduction at High Temperature: An Interplay of Biotic and Abiotic Reactions // Science. - 2013. - V. 340. - №6128. - P. 85-87.
277. **Liebner S. and Wagner D.** Abundance, distribution and potential activity of methane oxidizing bacteria in permafrost soils from the Lena Delta, Siberia // Environmental Microbiology. - 2007. - V. 9. - №1. - P. 107-117.
278. **Lin X., Handley K.M., Gilbert J.A., Kostka J.E.** Metabolic potential of fatty acid oxidation and anaerobic respiration by abundant members of *Thaumarchaeota* and

- Thermoplasmata* in deep anoxic peat // International Society for Microbial Ecology. – 2015. - V. 9. - №12. - P. 2740-2744.
279. **Liu, Y., Li, Z., Lin, Q. et al.** Structure and evolutionary origin of Ca²⁺-dependent herring type II antifreeze protein // PLoS ONE. – 2007. – V. 2, №6. – P. e548.
280. **Lloyd K., Schreiber L., Petersen D. et al.** Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // Nature. – 2013. - V. 496. - №7444. - P. 215-218.
281. **Lomans B.P., Maas R., Luderer R. et al.** Isolation and Characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from Freshwater Sediment, a Methylophilic Methanogen Able To Grow on Dimethyl Sulfide and Methanethiol // Appl Environ Microbiol. - 1999. - V. 65. - №8. - P. 3641-3650.
282. **Lonhienne T., Gerday C. and Feller G.** Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1543. P. 1–10.
283. **Lovley, D.R., and E.J.P. Phillips.** Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 52. P.751-757.
284. **Luton P.E., Wayne J.M., Sharp R.J., Riley P.W.** The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill // Microbiology. - 2002. - V. 148. - №11. - P. 3521-3530.
285. Ma, Y., and R. E. Marquis. Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic-acid bacteria // Antonie Leeuwenhoek. 1997. V. 72. P. 91–100.
286. Mackey, B. M. and J. G. Morris. Ultrastructural changes during sporulation in *Clostridium pasteurianum* // J Gen Microbiol. 1970. V.63. N. 3. P: 13.
287. **Magout, M., Basso, O., le Tardy-Jacquenod C. and Caumette P.** *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfate reducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water // Int J of Syst Evol Microbiol. 2004. V. 54. P. 1693–1697.
288. **Mah R.A., Kuhn D.A.** Rejection of the Type Species *Methanosarcina methanica* (Approved Lists 1980), Conservation of the Genus *Methanosarcina* with *Methanosarcina barkeri* (Approved Lists 1980) as the Type Species , and Emendation of the Genus *Methanosarcina* // Int J Syst Evol Microbiol. – 1984. - V. 34. – №2. - P. 266-267.
289. **Männistö M. K. et al.** *Granulicella arctica* sp. nov., *Granulicella mallensis* sp. nov., *Granulicella tundricola* sp. nov. and *Granulicella sapmiensis* sp. nov., novel acidobacteria from tundra soil // Int J Syst Evol Microbiol.. – 2012. – T. 62. – №. 9. – C. 2097-2106.

290. **Männistö M. K. et al.** *Terriglobus saanensis* sp. nov., an acidobacterium isolated from tundra soil // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2011. – T. 61. – №. 8. – C. 1823-1828.
291. **Margesin R., G. Neuner and K. B. Storey.** Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects // *Naturwissenschaften.* - 2007. - V. 94. - P. 77–99
292. **Margulis L., Margulis L.** Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archean and Proterozoic eons: 2nd ed. New York : Freeman, 1993. – P. 452.
293. Marion GM, Mironenko MV, Roberts MW FREZCHEM: A geochemical model for cold aqueous solutions. // *Computers & Geosciences, Workshop on Modeling Martian Hydrous Environments* (2009), 2010, 36, 1, 10-15.
294. **Marmur J.** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *Journal of molecular biology.* – 1961. – V. 3. – №2. – P. 208IN1-218.
295. **Martínez-Espinosa R.M., Richardson D.J., Bonete M.J.** Characterisation of chlorate reduction in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei* // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* - 2015. - V. 1850. - №4. - P. 587-594.
296. **Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S. and Scherer, S.** Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201 // *J Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 2916–2925.
297. **Medigue C, Krin E, Pascal G. et al.** Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // *Genome Res.* 2005. V. 15. P. 1325–1335.
298. **Meng J., Xu J., Qin D. et al.** Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses // *International Society for Microbial Ecology.* - 2014. -V. 8. - №3. - P. 650-659.
299. **Mergaert J. et al.** Characterization of Facultative Oligotrophic Bacteria from Polar Seas by Analysis of their Fatty Acids and 16S rDNA Sequences // *Syst. Appl Microbiol.* – 2001. – T. 24. – №. 1. – C. 98-107
300. **Mesbah N. M., Whitman W. B., Mesbah M.** Determination of the G+C Content of Prokaryotes // *Methods in Microbiology.* – 2011. – V. 38. – P. 299-324.
301. **Methe BA, Nelson KE, Deming JW et al.** The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. V. 102. P.10913–10918.
302. **Michel V., Labadie J., Hébraud M.** Effect of different temperature upshifts on protein synthesis by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* // *Current microbiology.* – 1996. – T. 33. – №. 1. – C. 16-25.

303. **Mickol, R. L., Laird, S. K., Kral, T. A.** Non-Psychrophilic Methanogens Capable of Growth Following Long-Term Extreme Temperature Changes, with Application to Mars // *Microorganisms*, 2018. 6(2), 34.
304. **Miller T. L., Wolin M. J.** Methanogens in human and animal intestinal tracts // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1986. – V. 7. – №2-3. – P. 223-229.
305. **Minnikin D.E., Collins M.D., Goodfellow M.** Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa // *Journal of Applied Microbiology*. – 1979. – V. 47. – №1. – P. 87-95.
306. **Miteva, V. I., Sheridan, P. P., Brenchley, J. E.** Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core // *Appl Environ Microbiol.* – 2004. – V. 70. – №1. – P. 202-213.
307. **Miyazaki M., Sakai S., Ritalahti K.M. et al.** *Sphaerochaeta multiformis* sp. nov., an anaerobic, psychrophilic bacterium isolated from seafloor sediment, and emended description of the genus *Sphaerochaeta* // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2014. - V. 64. - №12. - P. 4147-4154.
308. **Mohr, P. W., and S. Krawiec.** Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles, and thermophiles // *J. Gen. Microbiol.* 1980. V. 121. P. 311–318.
309. **Morita R.Y.** Psychrophilic bacteria // *Bacteriol. Rev.* 1975. V.39. P. 144-167.
310. **Mumma M.J., Novak R. E., DiSanti M.A., Bonev B.P.** A sensitive search for methane on Mars // *Bulletin of the American Astronomical Society*. – 2003. – V. 35. – P. 937.
311. **Mumma M.J., Villanueva G.L., Novak R.E. et al.** Strong Release of Methane on Mars in Northern Summer 2003 // *Science*. - 2009. - V. 323. - №5917 - P. 1041-1045.
312. **Murakami S., Fujishima, K., Tomita M., Kanai A.** Metatranscriptomic analysis of microbes in an Oceanfront deep-subsurface hot spring reveals novel small RNAs and type-specific tRNA degradation // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – V. 78. – №4. – P. 1015-1022.
313. **Murray R.** Microbial structure as an aid to microbial classification and taxonomy // *Spisy Prirodoved Fak Univ JE Purkyne Brne.* - 1968. -V. 43. - P. 249-252.
314. **Murray R., Doetsch R., Robinow C.** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Kreig N.R. – Washington DC: American Society for Microbiology, 1994. – P. 791.
315. **Muryoi, N., Sato, M., Kaneko, S. et al.** Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 // *J. Bacteriol.*– 2004.– V. 186, №17.– P. 5661–5671.
316. **Musfeldt M. and Schönheit P.** Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: heterologous expression and characterization of

- isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii* // J. Bacteriol. - 2002. -V. 184. - №3. - P. 636-644.
317. **Narihiro T., Sekiguchi Y.** Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea // Microbial Biotechnology. - 2011. - V. 4. - №5. - P. 585-602.
318. **Nelson N.A.** Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose // J Biol Chem. 1944. V.153. P.375.
319. **Nelson K.E., Clayton R.A., Gill S.R., Gwinn M.L.** Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* // Nature. – 1999. – V. 399. – №6734. – P. 323.
320. **Nelson D.M., Glawe A.J., Labeda D.P., Cann I.K., Mackie R.I.** *Paenibacillus tundrae* sp.nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra // Int J Syst Evol Microbiol. 2009 7:1708-14.
321. **Newsted, W.J., Polvi, S., Papish, B.** A low molecular weight peptide from snow mold with epitopic homology to the winter flounder antifreeze protein // Biochem. Cell Biol. – 1994.– V. 72, N3–4.– P.152–156.
322. **Nichols D.S., Miller M.R., Davies N.W. et al.** Cold Adaptation in the Antarctic Archaeon *Methanococcoides burtonii* Involves membrane lipid unsaturation // J. Bacteriol. 2004. V. 186. N. 24. P. 8508–8515.
323. **Nozhevnikova A.N., Zepp K., Vazquez F., Zehnder A.J.B., Holliger C.** Evidence for the existence of psychrophilic methanogenic communities in anoxic sediments of deep lakes // Appl Environ Microbiol. - 2003. -V. 69. - №3. - P. 1832-1835.
324. **Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Yakimov S., Gilichinsky D.** Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Esterase Produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian Cryopeg. // FEMS Microbial Ecology, 2012, № 82, P. 367-75.
325. **Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Kryukova E. et al.** Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. // Protein expression and purification. 2013. - V. 91. - P. 96-103.
326. **Nunoura T., Hirayama H., Takami H. et al.** Genetic and functional properties of uncultivated thermophilic crenarchaeotes from a subsurface gold mine as revealed by analysis of genome fragments // Environmental Microbiology. - 2005. - V. 7. - №12. - P. 1967-1984.
327. **Nunoura T., Oida H., Miyazaki J. et al.** Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities // FEMS Microbiology and Ecology. - 2008. -V. 64. - №2. - P. 240-247.

328. **Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J. et al.** Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group // *Nucleic Acids Research*. - 2010 - V. 39. - №8. - P. 3204-3223.
329. **Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C.** Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR // *Environmental Microbiology*. -2003. -V. 5. - №9. - P. 787-797.
330. **Omel'chenko M., Vasil'Eva L., Zavarzin G. et al.** A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter* // *Microbiology*. - 1996. - V. 65. - №3. - P. 339-343.
331. **Orange, N.** Growth temperature regulates the induction of β -lactamase in *Pseudomonas fluorescens* through modulation of the outer membrane permeation of a β -lactam-inducing antibiotic // *Microbiology*. 1994. V. 140. P. 3125–3130.
332. **Oren A., Elevi Bardavid R., Mana L.** Perchlorate and halophilic prokaryotes: Implications for possible halophilic life on Mars // *Extremophiles*. - 2014. - V. 18. - №1. - P. 75-80.
333. **Oshima M., Miyagawa A.** Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria // *Lipids*. – 1974. – T. 9. – №. 7. – C. 476-480.
334. **Ostroumov V.** Physico-chemical processes in cryogenic soils // *Cryosols*. – Springer Berlin Heidelberg, 2004. – P. 347-364.
335. **Osuga, D.T., Feeney, R.E.** Antifreeze lycoproteins from Arctic fish // *J. Biol. Chem.* – 1978. – Vol. 253, №15. – P. 5338–5343.
336. **Ozerskaya, S., Ivanushkina, N., Kochkina, G., Fattakhova, R. and Gilichinsky D.** Mycelial fungi from cryopegs // *Int. J. Astrobiology*. 2004. V. 3. N.2. P. 27-34.
337. **Panadero, J., Randez-Gil, F., Prieto, J.A.** Heterologous expression of type I antifreeze peptide GS-5 in baker's yeast increases freeze tolerance and provides enhanced gas production in frozen dough // *J. Agric. Food Chem.*– 2005.– V. 53, №26.– P. 9966–9970.
338. **Parrou, J.L., Teste, M.A., and Fransois, J.,** Effects of Various Types of Stress on the Metabolism of Reserve Carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Evidence for a Stress Induced Recycling of Glycogen and Trehalose, *Microbiology (UK)*, 1997, vol. 143, pp. 1891–1900.
339. **Parshina S.N., Ermakova A.V., Bomberg M., Detkova E.N.** *Methanospirillum stamsii* sp. nov., a psychrotolerant, hydrogenotrophic, methanogenic archaeon isolated from an anaerobic expanded granular sludge bed bioreactor operated at low temperature // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2014. – V. 64. – №1. – P. 180-186.

340. **Paul K., Nonoh J.O., Mikulski L., Brune A.** "Methanoplasmatales," "Thermoplasmatales"-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens // *Appl Environ Microbiol.* - 2012. -V. 78. - №23. - P. 8245-8253.
341. **Pecheritsyna, S.A., Rivkina, E.M., Akimov, V.N., & Shcherbakova, V.A.** *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2012. – V. 62. – №1. – P. 33-37.
342. **Pester M., Schleper C., Wagner M.** The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // *Current Opinion in Microbiology.* - V. 14. - №3. - P. 300-306.
343. **Piao AL, Feng XM, Nogi Y, Han L, Li Y, Lv J.** *Sphingomonas qilianensis* sp.nov., Isolated from Surface Soil in the Permafrost Region of Qilian Mountains, China // *Curr Microbiol.* – 2016. - V. 72. - №4. – P. 363-9.
344. **Ponder M.A., Gilmour S.J., Bergholz P.W. et al.** Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria // *FEMS Microbiology and Ecoljgy.* - 2005. - V. 53. – №1. - P. 103-115.
345. **Postgate, J.** (1959). Sulphate reduction by bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 13(1), 505-520.
346. **Powell G.E.** Interpretation of gas kinetics of batch cultures // *Biotech. Lett.* 1983. V.5. N. 7. P. 437-440.
347. **Pühler G., Leffers H., Gropp F. et al.** Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1989. - V. 86. - №12. - P. 4569-4573.
348. **Pudney, P.D., Buckley S.L., Sidebottom C.M. et al.** The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) // *Arch.Biochem. Biophys.* – 2003. – V. 410. - №2. – P. 238–245.
349. **Pullin, A.S.** Evolution of cold hardiness strategies in insects: Symposium on Cold Hardiness in animals and plants, 11-16 July, 1993 // *Cryo-Lett.* – 1994. – V. 15, №1. – P. 25.
350. **Rabus R, Ruepp A, Frickey T. et al.** The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfatereducing bacterium from permanently cold Arctic sediments // *Environ Microbiol.* 2004. V. 6. P. 887–902.
351. **Ran, Y., Li, X., Cheng, G., Zhang, T., Wu, Q., Jin, H., Jin, R.** Distribution of permafrost in China: an overview of existing permafrost maps // *Permafrost and Periglacial Processes.* – 2012. – V. 23. – №4. – P. 322-333.
352. **Ray M K, Sitaramamma T, Gandhi S and Shivaji S.** Occurrence and expression of *cspA* a cold shock gene in Antarctic psychrotrophic bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V.116. P. 55–60.

353. **Raymann K., Brochier-Armanet C.I., Gribaldo S.** The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2015. - V.112. - №21. - P. 6670-6675.
354. **Raymond, J.A., DeVries, A.L.** Adsorption inhibition as a mechanisms of freezing resistance in polar fishes // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1977. – V.74, №6. – P. 2589-2593.
355. **Raymond, J.A., Knight, C.A.** Ice binding, recrystallization inhibition, and cryoprotective properties of ice-active substances associated with Antarctic sea ice diatoms // *Cryobiology*. – 2003. – V. 46. - №2. – P. 174–181.
356. **Raymond J.A., Christner B.C., Schuster S.C.** A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core // *Extremophiles*. – 2008. - V. 12. - №5. – P.713–717.
357. **Raymond, J.A., Fritsen, C., and Shen, K.** An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium // *FEMS Microbiol Ecol*. – 2007. V. 61. P. 214–221.
358. **Reddy G. S. et al.** Draft genome sequence of *Psychrobacter aquaticus* strain CMS 56T, isolated from a cyanobacterial mat sample collected from water bodies in the McMurdo dry valley region of Antarctica // *Genome announcements*. – 2013. – T. 1. – №. 6. – C. e00918-13.
359. **Reid I.N., Sparks W.B., Lubow S. et al.** Terrestrial models for extraterrestrial life: methanogens and halophiles at Martian temperatures // *Int J Astrobiol*. -2006. -V. 5. - №2. - P. 89.
359. **Regand A., Goff H.D.** Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass // *J. Dairy Sci.* – 2006. – V. 89, №1. – P. 49–57.
360. **Reynolds E.S.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *The Journal of Cell Biology*. – 1963. – V. 17. – №1. – P. 208.
361. **Richter M., Rosselló-Móra R., Oliver Glöckner F., Peplies J.** JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison // *Bioinformatics*. - 2016. - V. 32. - P. 929–931.
362. **Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A. et al.** Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // *Nature*. – 2013. – V. 499. – P. 431.
363. **Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D. et al.** *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2012. - V. 62. - №1. - P. 210-216.
364. **Rivkina E.M., Samarkin V.A., Gilinskiy D.A.** Methane and permafrost soil of the Kolyma-Indigir lowland // *Eurasian Soil Science*. – 1992. – V. 25. – №1. – P. 50-53.
365. **Rivkina E., Gilichinsky D., Wagener S., Tiedje J., McGrath J.** Biogeochemical activity of anaerobic microorganisms from buried permafrost sediments // *Geomicrobiol J*. - 1998. - V. 15. - №3. - P. 187-193.

366. **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. – V. 66. – №8. – P. 3230-3233.
367. **Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J., Tiedje J., Shcherbakova V., Gilichinsky D.** Microbial life in permafrost // *Advances in Space Research.* - 2004. -V. 33. - №8. - P. 1215-1221.
368. **Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichius K. et al.** Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost // *FEMS Microbiology and Ecology.* - 2007. - V. 61. - №1. - P. 1-15.
369. **Rivkina E., Petrovskaya L., Vishnivetskaya T. et al.** Metagenomic analyses of the late Pleistocene permafrost - Additional tools for reconstruction of environmental conditions // *Biogeosciences.* - 2016. - V. 13. - №7. - P. 2207-2219.
370. **Rodrigues D.F., Jesus E.d.C., Ayala-del-Rio H.L. et al.** Biogeography of two cold adapted genera *Psychrobacter* and *Exiguobacterium* // *International Society for Microbial Ecology.* - 2009. – V. 3. – №6. - P. 658-665.
371. **Rodrigues, D. F. and J. M. Tiedje.** Multi-locus real-time PCR for quantitation of bacteria in the environment reveals *Exiguobacterium* to be prevalent in permafrost // *FEMS Microbiol Ecol.* 2006. V.59. P. 489-499.
372. **Romanenko L.A., Lysenko A.M., Rohde M., Mikhalov V.V. and Stackebrandt E.** *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan // *Int J Syst Evol Bacteriol.* - 2004. - V. - 54. - P. 1741-1745.
373. **Rossello-Mora R., Urdiain M., Lopez-Lopez A.** DNA-DNA Hybridization // *Methods in Microbiology.* In: Rainey F., Oren A., 2011. - V. 38. – P. 325-347.
374. **Ruger H.-J.** Substrate-dependent cold adaptations in some deep-sea sediment bacteria // *System. Appl. Microbiol.* 1988. № 11. pp. 90-93.
375. **Rummel J.D., Beaty D.W., Jones M.A. et al.** A New Analysis of Mars “Special Regions”: Findings of the Second MEPAG Special Regions Science Analysis Group (SR-SAG2) // *Astrobiology.* - 2014. -V. 14. - P. 887-968.
376. **Russell, R. J., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. and Taylor, G. L.** Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium // *Structure.* 1998. V. 6. 351–361.
377. **Raymond, J.A., DeVries, A.L.** Adsorption inhibition as a mechanisms of freezing resistance in polar fishes // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1977. – V.74. - №6. – P. 2589-2593.

378. **Saitou N., Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – V. 4. – №4. – P. 406-425.
379. **Sakai S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y.** *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2008. - V. 58. - №4. - P. 929-936.
380. Saruyama, H., and S. Sasaki. Protein synthesis in psychrotrophic and psychrophilic bacteria at various temperatures // *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser.* 1980. V. 12. P. 107–110.
381. **Sasser M.** Identification of bacteria through fatty acid analysis // *Methods in Phytobacteriology*. – 1990. – P. 199-204.
382. **Savant D.V., Shouche Y.S., Prakash S., Ranade D.R.** *Methanobrevibacter acididurans* sp. nov., a novel methanogen from a sour anaerobic digester // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2002. - V. 52. - №4. - P. 1081-1087.
383. **Saunders, N. F. et al.** Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii* // *Genome Res*. 2003. V. 13. P. 1580–1588.
384. **Scherer S., Neuhaus K.** Life at low temperatures. In: M. Dworkin et al., eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.9, January 4, 2002, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
385. **Schirrmeister L., Kunitsky V., Grosse G. et al.** Sedimentary characteristics and origin of the Late Pleistocene Ice Complex on north-east Siberian Arctic coastal lowlands and islands—A review // *Quaternary international*. – 2011. - V. 241. - №1. - P. 3-25.
386. **Schleifer K. H. and Kandler O.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol Rev*. – 1972. – V. 36. - P. 407–477.
387. **Scholander, P. F., VanDam, L., Kanwisher, J.W. et al.** Supercooling and osmoregulation in arctic fish // *J. Cell. Comp. Physiol*. - 1957.- V.49. - P.5–24.
388. **Schuur E. A. G., McGuire A. D., Schädel C. et al.** Climate change and the permafrost carbon feedback // *Nature*. – 2015. – V. 520. – №7546. – P. 171-179.
389. **Seitz K.W., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P., Baker B.J.** Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction // *International Society for Microbial Ecology*. – 2016. - V. 10. - №7. - P. 1696.

390. **Shcherbakova V., Rivkina E., Laurinavichius K., Pecheritsyna S., Gilichinsky D.** Physiological characteristics of bacteria isolated from water brines within permafrost // *International Journal of Astrobiology*. - 2004. - V. 3. - №1. - P. 37-43.
391. **Shcherbakova, V.A., Chuvilskaya, N.A., Rivkina, E.M. et al.** Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov // *Extremophiles*. – 2005. – V. 9. – №3. – P. 239-246.
392. **Shcherbakova V.A., Laurinavichius K.S., Akimenko V.K.** Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community // *Chemosphere*. – 1999. -. V. 39. №11. – P. 1861-1870.
393. **Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D.** *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2011. -V. 61. - №1. - P. 144-147.
394. **Shcherbakova V., Chuvilskaya N., Rivkina E. et al.** *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2013. – V. 63. – №12. – P. 4421-4427.
395. **Shcherbakova V., Oshurkova V., Yoshimura Y.** The Effects of Perchlorates on the Permafrost Methanogens: Implication for Autotrophic Life on Mars // *Microorganisms*. – 2015. – V. 3. – №3. – P. 518-534.
396. **Shcherbakova, V., Yoshimura, Y., Ryzhmanova Y. et al.** Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost // *FEMS Microbiology and Ecology*. – 2016. – V. 92. – №10. – P. fiw135.
397. **Shneppenheim, R., Theede, H.** Isolation and characterization of freezing point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor* // *Comp. Biochem. Physiol.*– 1980.– V. 67B, №6.–P. 561–568.
398. **Shi T., Reeves R.H., Gilichinsky D.A., Friedmann E.I.** Characterization of viable bacteria from siberian permafrost by 16S rDNA sequencing // *Microbial Ecology*. - 1997. - V. 33. - №3. - P. 169-179.
399. **Shimizu S., Ueno A., Naganuma T., Kaneko K.** *Methanosarcina subterranea* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface diatomaceous shale formation // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2015. - V. 65. - №4. - P. 1167-1171.
400. **Shlimon A.G., Friedrich M.W., Niemann H., Ramsing N.B., Finster K.** *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark) // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2004. - V. 54. - №3. - P. 759-763.

401. **Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Stackebrandt E. et al.** *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil // Archives of Microbiology. - 2000. - V. 174. - №6. - P. 440-447.
402. **Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P. et al.** *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a New Psychrotolerant Methanogenic Archaeon from Anoxic Lake Sediments // Syst Appl Microbiol. - 2001. - V. 24. - №3. - P. 362-367.
403. **Sinha, N., Kral, T. A.** (2018). Effect of UVC Radiation on Hydrated and Desiccated Cultures of Slightly Halophilic and Non-Halophilic Methanogenic Archaea: Implications for Life on Mars // Microorganisms, 6(2).
404. **Singh N., Kendall M.M., Liu Y., Boone D.R.** Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica* // Int J Syst Evol Microbiol. – 2005. – V. 55. – №6. – P. 2531-2538.
405. **Somero, G. N.** Proteins and temperature // Annu. Rev. Physiol. 1995. V.57. P. 43–68.
406. **Sorokin D. Y., Abbas B., Geleijnse M. et al.** Methanogenesis at extremely haloalkaline conditions in the soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia) // FEMS Microbiology Ecology. – 2015. – V. 91. – №4. – P. fiv016.
407. **Sorokin D.Y., Merkel A.Y., Abbas B. et al.** *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and '*Candidatus* Methanohalarchaeum thermophilum', extremely halo(natrono)philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia* classis nov. // Int J Syst Evol Microbiol. 2018 May 21.
408. **Spang A., Martijn J., Saw J.H., Lind A.E., Guy L., Ettema T.J.** Close encounters of the third domain: the emerging genomic view of archaeal diversity and evolution // Archaea. – 2013. - V. 2013.
409. **Spang A., Saw J.H., Jørgensen S.L. et al.** Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes // Nature. – 2015. – V. 521. – №7551. – P. 173-179.
410. **Spang, A., & Ettema, T. J.** Archaeal evolution: The methanogenic roots of Archaea // Nature microbiology. - 2017. - V. 2(8). – P. 17109.
411. **Spirina, E., J. Cole, B. Chai, J. Tiedje, D. Gilichinsky.** New high through put approach to study ancient microbial phyligenetic diversity in permafrost // Cryospheric Sciences Programme. 2003. Vol. 5. Abstract EAE03-A-01243.
412. **Spring S, Merkhoffer B, Weiss N, Kroppetstedt R, Hippe H, Stackebrandt E** Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *C. lacusfryxellense* sp. nov., *C. bowmanii* sp. nov. and *C. ps*

- ychrophilum* sp. nov. and reclassification of *C. laramiense* as *C. estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. // Int J Syst Evol Bacteriol. - 2003. V. 53. - P. 1019-1029.
413. **Springer E., Sachs M.S., Woese C.R., Boone D.R.** Partial Gene Sequences for the A Subunit of Methyl-Coenzyme M Reductase (mcrI) as a Phylogenetic Tool for the Family *Methanosarcinaceae* // Int J Syst Evol Bacteriol. - 1995. - V. 45. - №3. - P. 554-559.
414. **Stams F.J.M., M. Veenhuis, G.H. Weenk, and T.A. Hansen** . Occurrence of polyglucose as a storage polymer in *Desulfovibrio* species and *Desulfobulbus propionicus* // Arch. Microbiol. 1983. V.136. N.1. P.54-59.
415. **Stanier R., Adelberg E., Ingraham J.** The Microbial World. Prentice Hall // Inc New Jersey, – 1976. - P. 276. -1976.
416. **Stetter K.O.** Hyperthermophiles in the history of life // Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. - 2006. - V. 361. - №1474. - P. 1837-1843.
417. **Steven B., Pollard W., McKay C.P., Greer C.W., Whyte L.G.** Diversity of culturable bacteria isolated from permafrost and ground ice from the Canadian High Arctic. *In*: 10th International symposium on microbial ecology. – 2004. – P. 123-134.
418. **Steven B., Leveille R., Pollard W.H., Whyte L.G.** Microbial ecology and biodiversity in permafrost // Extremophiles. - 2006. - V. 10. – №4. - P. 259-267.
419. **Steven B., Briggs G., McKay C.P. et al.** Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. // FEMS Microbiology and Ecology. - 2007. - V. 59. - №2. - P. 513-23.
420. **Steven B., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G.** Microbial diversity and activity through a permafrost/ground ice core profile from the Canadian high Arctic // Environmental Microbiology. - 2008. - V. 10. - №12. - P. 3388-3403.
421. **Steven B., Niederberger T.D., Whyte L.G.** Bacterial and Archaeal Diversity in Permafrost. *In*: Margesin, R. Permafrost Soils, Soil Biology, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2009. – P. 59-72.
422. **Stevenson A., Cray J.A., Williams J.P. et al.** Is there a common water-activity limit for the three domains of life? // International Society for Microbial Ecology. - 2015. - V. 9. - №6. - P. 1333-1351.
423. **Stewart L.C., Jung J.H., Kim Y.T. et al.** *Methanocaldococcus bathoardescens* sp. nov., a hyperthermophilic methanogen isolated from a volcanically active deep-sea hydrothermal vent // Int J Syst Evol Microbiol. - 2015. - V. 65. - №4. - P. 1280-1283.
424. **Stewart W.D.P., Fitzgerald G.P., Burris R.H.** Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae // Arch Microbiol. – 1968. – V.62. – P. 336–348.

425. **Strasidine G.A.** The role of intracellular glucan in endogenous fermentation and spore maturation in *Clostridium botulinum* type E // Can. J. Microbiol. 1972. V.18. P.211-217.
426. **Strauss J. et al.** The deep permafrost carbon pool of the Yedoma region in Siberia and Alaska //Geophysical Research Letters. – 2013. – T. 40. – №. 23. – C. 6165-6170.
427. **Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J.E. et al.** *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota* // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - V. 64. - №8. - P. 2738-2752.
428. **Suetin S.V., Shcherbakova V.A., Chuvilskaya, N.A. et al.** *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost // Int J Syst Evol Microbiol. – 2009. – V. 59. – №6. – P. 1421-1426.
429. **Suutari, M. and Laakso, S.** Microbial fatty acids and thermal adaptation // Crit. Rev. Microbiol. 1994. V. 20. P. 285-328.
430. **Suzina, N. E., Mulyukin, A. L., Dmitriev, V. V. et al.** (2006). The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria // Advances in Space Research. – 2006.- V. 38(6). – P. 1209-1219.
431. **Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N.** Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6 // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2001. - V. 92. - №2. - P. 144-148.
432. **Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T. et al.** Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR // Appl Environ Microbiol. -2001. - V. 67. - №6. - P. 2766-2774.
433. **Takeuchi, Y., Ohnishi, S.I., Ishinaga, M. and Kito M.** Spin-labeling of *Escherichia coli* membrane by enzymatic synthesis of phosphatidylglycerol and divalent cation-induced interaction of phosphatidylglycerol with membrane proteins // Biochim. Biophys.Acta. 1978. V. 506. P. 54-63.
434. **Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – V. 30. – №12. – P. 2725-2729.
435. **Tarpgaard, I. H., A. Boetius, Finster, K.** *Desulfobacter psychrotolerans* sp. nov., a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium and descriptions of its physiological response to temperature changes // Antonie Van Leeuwenhoek. 2006. V. 89. N. 1. P. 109-24.
436. **Taş N., Prestat E., McFarland J.W. et al.** Impact of fire on active layer and permafrost microbial communities and metagenomes in an upland Alaskan boreal forest // Int J Syst Evol Microbiol. – 2014. – V. 8. – №9. – P. 1904.

437. **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Research*. – 1994. – V. 22. – №22. – P. 463-4680.
438. **Tomczak, M.M., Hinch, D.K., Estrada, S.D. et al.** A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein // *Biophys. J.* – 2002.– V. 82, №2.– P. 874–881.
439. **Troshina O., Oshurkova V., Suzina N. et al.** *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – V. 65. – №12. – P. 4315-4322.
440. **Trotsenko Y.A. and Khmelenina V.N.** Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems // *FEMS Microbiol Ecology*. - 2005. - V. 53. – №1. - P. 15-26.
441. **Unell, M., N. Kabelitz, Jansson, J. K. Heipieper, H. J.** Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids // *FEMS Microbiol Lett.* 2007. V. 266. N. 2. P. 138-143.
442. **Van Everdingen R.O.** Geocryological terminology // *Canadian Journal of Earth Sciences*. – 1976. – V. 13. – №6. – P. 862-867.
443. **Vandieken, V., C. Knoblauch, Jorgensen, B. B.** *Desulfovibrio frigidus* sp. nov. and *Desulfovibrio ferrireducens* sp. nov., psychrotolerant bacteria isolated from Arctic fjord sediments (Svalbard) with the ability to reduce Fe(III) // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. V. 56(Pt 4). P. 681-5.
444. **Vandieken V. et al.** *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe (III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. – T. 56. – №. 5. – C. 1133-1139.
445. **Valentine, D. L.** Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // *Nature Rev. Microbiol.* - 2007. – V. 5. – P. 316–323.
446. **Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H. et al.** Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota* // *Nature Microbiology.* - 2016 - V.1. - P. 16170.
447. **Vatsurina A., Badrutdinova D., Schumann P., Spring, S. Vainshtein M.** *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2008. - V.58 -№5. – P. 1228-1232.
448. **Venketesh, S., Dayananda, C.** Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins// *Crit Rev Biotechnol.* – 2008. - V. 28, №1. – P.57-82.

449. **Vianna M.E., Holtgraewe S., Seyfarth I., Conrads G., Horz H.P.** Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease // *Journal of Bacteriology*. -2008. - V. 190. - №10. - P. 3779-3785.
450. **Vishnivetskaya T.A., Petrova M.A., Urbance J. et al.** Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods // *Astrobiology*. - 2006. – V. 6. – №3. - P. 400-414.
451. **Vishnivetskaya T, Kathariou S, McGrath J, Gilichinsky DA, Tiedje JM.** Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments // *Extremophiles*. 2000. V.4. P.165–173.
452. **Vishnivetskaya T., Erokhina L., Spirina E., Shatilovich A., Vorobyova E.A., Gilichinsky D.** Ancient viable green algae and cyanobacteria from permafrost. In: *Algae and extreme environments*, (Eds., Elster J., Seckbach J., Vincent W., Lhotsky O.), Nova Hedwigia Beiheft, 2001. V. 123. P. 427-441.
453. **Vincent W. F.** Microbial ecosystem responses to rapid climate change in the Arctic // *The ISME Journal*. – 2010. – T. 4. – №. 9. – C. 1087.
454. **Von Klein D., Arab H., Völker H., Thomm M.** *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea // *Extremophiles*. - 2002. - V. 6. - №2. - P. 103-110.
455. **Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M. et al.** The deep cold biosphere: facts and hypothesis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1997. – V. 20. – №3-4. – P. 277-290.
456. **Wagner M. et al.** Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration // *J Bacteriol*. – 1998. – T. 180. – №. 11. – C. 2975-2982.
457. **Wagner D., Kobabe S., Pfeiffer E.M., Hubberten H.W.** Microbial controls on methane flux from polygonal tundra of the Lena Delta, Siberia // *Permafrost and Periglacial Processes*. – 2003. – №14. – P. 173–185.
458. **Wagner D., Lipski A., Embacher A., Gattinger A.** Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: Effects of microbial community structure and organic matter quality // *Environmental Microbiology*. - 2005. - V. 7. - №10. - P. 1582-1592.
459. **Wagner D.** Microbial communities and processes in Arctic permafrost environments // *Microbiology of Extreme Soils*. – 2008. – P. 133-154.
460. **Wagner D., Schirmack J., Ganzert L., Morozova D., Mangelsdorf K.** *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2013. - V. 63. - №8. - P. 2986-2991.

461. **Walker, V.K., Palmer, G.R., Voordouw, G.** Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community // *Appl Environ Microbiol.* - 2006. – V.72, №3. – P.1784-1792.
462. **Walter K. M., Zimov S. A., Chanton J. P., Verbyla D., & Chapin F. S.** Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming // *Nature.* – 2006. – V. 443. – №7107. – P. 71-75.
463. **Wang Q, Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – V. 73. – №16. – P. 5261-5267.
464. **Wartiainen I., Hestnes A.G., McDonald I. R., Svenning, M.M.** *Methylobacter tundripaludum* sp. nov., a methane-oxidizing bacterium from Arctic wetland soil on the Svalbard islands, Norway (78 N) // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. – V. 56. – №1. – P. 109-113.
465. **Welander P. V., Metcalf W. W.** Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – V. 102. – №30. – P. 10664-10669.
466. **Whalen S.C., Reeburgh W.S., Sandbeck K.A.** Rapid methane oxidation in a landfill cover soil // *Appl Environ Microbiol.* – 1990. – V. 56. – №11. – P. 3405-3411.
467. **Wei S., Cui H., He H., Hu F., Su X., Zhu Y.** Diversity and distribution of archaea community along a stratigraphic permafrost profile from Qinghai-Tibetan plateau, China // *Archaea.* - 2014. - V. 2014. - P. 1-11.
468. **Weiss B.P., Yung Y.L., Nealson K.H.** Atmospheric energy for subsurface life on Mars? // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2000. - V. 97. - №4. - P. 1395-1399.
469. **Whitman, W. B., Bowen, T. L., Boone, D. R. et al.** (1992). The methanogenic bacteria. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, vol. I.*, (Ed. 2), 719-767.
470. **Wilhartitz I., Mach R.L., Teira E. et al.** Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground-and drinking water // *J Appl Microbiol.* – 2007. – T. 103. – №4. – C. 871-881.
471. **Wilson, S.L., Walker, V.K.** Selection of low-temperature resistance in bacteria and potential applications// *Environ Technol.* - 2010. – V.31, №8-9. – P.943-56.
472. **Wilhelm R. C., Niederberger T.D., Greer C., Whyte L.G.** Microbial diversity of active layer and permafrost in an acidic wetland from the Canadian High Arctic // *Can. J. Microbiol.* – 2011. – V. 57. – №4. – P. 303-315.
473. **Wilkinson, J.F.** The problem of energy-storage compounds in bacteria // *Exp. Cell Res. Suppl.* 1959. V. 7. P.111-130.

474. **Willerslev, E., Hansen, A.J., Ronn, R. et al.** Long-term persistence of bacterial DNA // *Current Biology*. - 2004. - №1. – P. R9-R10.
475. **Willerslev E., Hansen A. J., Poinar H. N.** Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost // *Trends in Ecology and Evolution*. – 2004. – V. 19. – №3. – P. 141-147.
476. **Williams T.A., Szöllösi G.J., Spang A. et al.** Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2017. – P. 201618463.
477. **Winkel M., Mitzscherling J., Overduin P.P. et al.** Anaerobic methanotrophic communities thrive in deep submarine permafrost // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8(1). – P. 1291.
478. **Spang A., Caceres E. F. Ettema T. J.** Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life // *Science*. – 2017. - V. 357(6351), eaaf3883.
479. **Woese C.R.** Bacterial evolution // *Microbiological Reviews*. - 1987. - V. 51. - №2. - P. 221.
480. **Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1990. -V. 87. - №12. -P. 4576-4579.
481. **Woese C.R.** Prokaryote systematics: the evolution of a science // *The Prokaryotes*. - 1992. -V. 1. - №1. - P. 3-18.
482. **Wolin, E. A., M. J. Wolin, and R. S. Wolfe.** Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* - 1963. - V. 238. - P. 2882–2886.
483. **Worakit S., Boone D.R., Mah R.A., Abdel-Samie M.-E., El-Halwagi M.M.** *Methanobacterium alcaliphilum* // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 1986. - V. 36. - №3. - P. 380-382.
484. **Wright J.F., Chuvilin E.M., Dallimore S.R. et al.** Methane hydrate formation and dissociation in fine sands at temperatures near 0 C // *Proceeding of the 7th International Conference on Permafrost at Yellowknife, Canada*. – 1998. – P. 1147-1153.
485. **Xiao, N., Suzuki, K., Nishimiya, Y. et al.** Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*// *FEBS J*. – 2010. – V. 277, №2. – P.394-403.
486. **Xu H., Griffith M., Patten C.L. and Glick B.R.** Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2// *Can. J. Microbiol*. - 1998. –V. 44. - P.64-73.
487. **Yaish, M.W., Doxey, A.C., McConkey, B.J. et al.** Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity // *Plant Physiol*. – 2006.– V. 141, №4.– P. 1459–1472.

488. **Yamashita, Y., Nakamura, N., Omiya, K. et al.** Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin // *Biosci Biotechnol Biochem.* - 2002. - V.66. - P. 239–247.
489. **Yang D.Q., Wang J.H., Bai Y. et al.** Diversity and distribution of the prokaryotic community in near-surface permafrost sediments in the Tianshan Mountains, China // *Can J Microbiol.* - 2008. – V.54. – №4. - P. 270-280.
490. **Yang Y.-L., Ladapo J., Whitman W.B.** Pyruvate oxidation by *Methanococcus* spp. // *Archives of Microbiology.* - 1992. -V. 158. - №4. - P. 271-275.
491. **Yashiro Y., Sakai S., Ehara M., Miyazaki M., Yamaguchi T., Imachi H.** *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2011. - V. 61. - №1. - P. 53-59.
492. **Yergeau E., Hogues H., Whyte L.G., Greer C.W.** The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses // *International Society for Microbial Ecology.* - 2010. - V. 4. - №9. - P. 1206-1214.
493. **Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S.** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnology and Bioengineering.* - 2005. - V. 89. - №6. - P. 670-679.
494. **Yu J., Cheng C.H., DeVries A.L. et al.** Characterization of a multimer type III antifreeze protein gene from the Antarctic eel pout (*Lycodichthys dearborni*) // *Yi Chuan Xue Bao.*– 2005.–V. 32, №8.– P. 789–794.
495. **Yu C.S., Lu C.H.** Identification of antifreeze proteins and their functional residues by support vector machine and genetic algorithms based on n-peptide compositions// *PLoS One.*- 2011.-V.6. - N.5.:e20445.
496. **Yu, Z., Gunn, L., Brennan, E., Reid, R. et al.** Complete Genome Sequence of *Clostridium estertheticum* DSM 8809, a Microbe Identified in Spoiled Vacuum Packed Beef // *Frontiers in microbiology.* -2016. - V. 7. – P. 1764.
497. **Yutin N., Makarova K.S., Mekhedov S.L., Wolf Y.I., Koonin E.V.** The deep archaeal roots of eukaryotes // *Molecular Biology and Evolution.* - 2008. -V. 25. - №8. - P. 1619-1630.
498. **Yutin N., Puigbò P., Koonin E.V., Wolf Y.I.** Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins // *PloS One.* – 2012. - V. 7. - №5. - P. e36972.
499. **Zak D.R. and Kling G.W.** Microbial community composition and function across an arctic tundra landscape // *Ecology.* - 2006. - V. 87. - №7. - P. 1659-1670.
500. **Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H. et al.** Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature.* 2017. - V. 541. - №7637. - P. 353-358.

501. **Zehnder A.J.B. and Schnell P.** Methane Formation and Methane Oxidation by Methanogenic Bacteria // J Bacteriol. - 1979. - V. 137. - №1. - P. 420-432.
502. **Zhang G.S., Ma X.J., Niu F.J. et al.** Diversity and distribution of alkaliphilic psychrotolerant bacteria in the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region // Extremophiles. - 2007. - V. 11. - №3. - P. 415-424.
503. **Zhang G., Jiang N., Liu X., Dong X.** Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, "*Methanolobus psychrophilus*" sp. nov., prevalent in Zoige wetland of the Tibetan plateau // Appl Environ Microbiol. - 2008. - V. 74. - №19. - P. 6114-6120.
504. **Zheng R, Zhao Y, Wang L. et al.** *Mucilaginibacter antarcticus* sp. nov., isolated from tundra soil // Int J Syst Evol Microbiol. – 2016. – V.66. - №12. – P. 5140-5144.
505. **Zhilina T. N., Zavarzin G. A.** *Methanosarcina vacuolata* sp. nov., a vacuolated *Methanosarcina* // Int J Syst Evol Microbiol. – 1987. – T. 37. – №. 3. – C. 281-283.
506. **Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kevbrin V.V., Kolganova T.V.** *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family *Methanocalculaceae* // Microbiology. - 2013. - V. 82. - №6. - P. 698-706.
507. **Zhou J., Davey M.E., Figueras J.B. et al.** Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra // Microbiology. - 1997. - V. 143. - №12. - P. 3912-3919.
508. **Zhou L., Liu X., Dong X.** *Methanospirillum psychrodurum* sp. nov., isolated from wetland soil // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - V. 64. - №2. - P. 638-641.
509. **Zhu J., Liu X., Dong X.** *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment // Int J Syst Evol Microbiol. - 2011. - V. 61. - №12. - P. 2974-2978.
510. **Zimov S.A.** North Siberian Lakes: A Methane Source Fueled by Pleistocene Carbon // Science. - 1997. - V. 277. - №5237. - P. 800-802.
511. **Zinder S. H.** Physiological ecology of methanogens // Methanogenesis. – Springer US, 1993. – P. 128-206.
512. **Zou R, Zhang Y, Zhou X, Wang Y, Peng F.** *Spirosoma flavum* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil // Int J Syst Evol Microbiol. – 2017. – V. 67. №12 - P. 4911-4916.
513. **Zvyagintsev D.G.** Microorganisms in permafrost. Phisiol. Gen. Biol. Rev. Russ. Sci. Rev. / Ed. T.M. Turpaev. Harwood Academic Publishers GmbH. 1995. pp.325.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Районы исследования

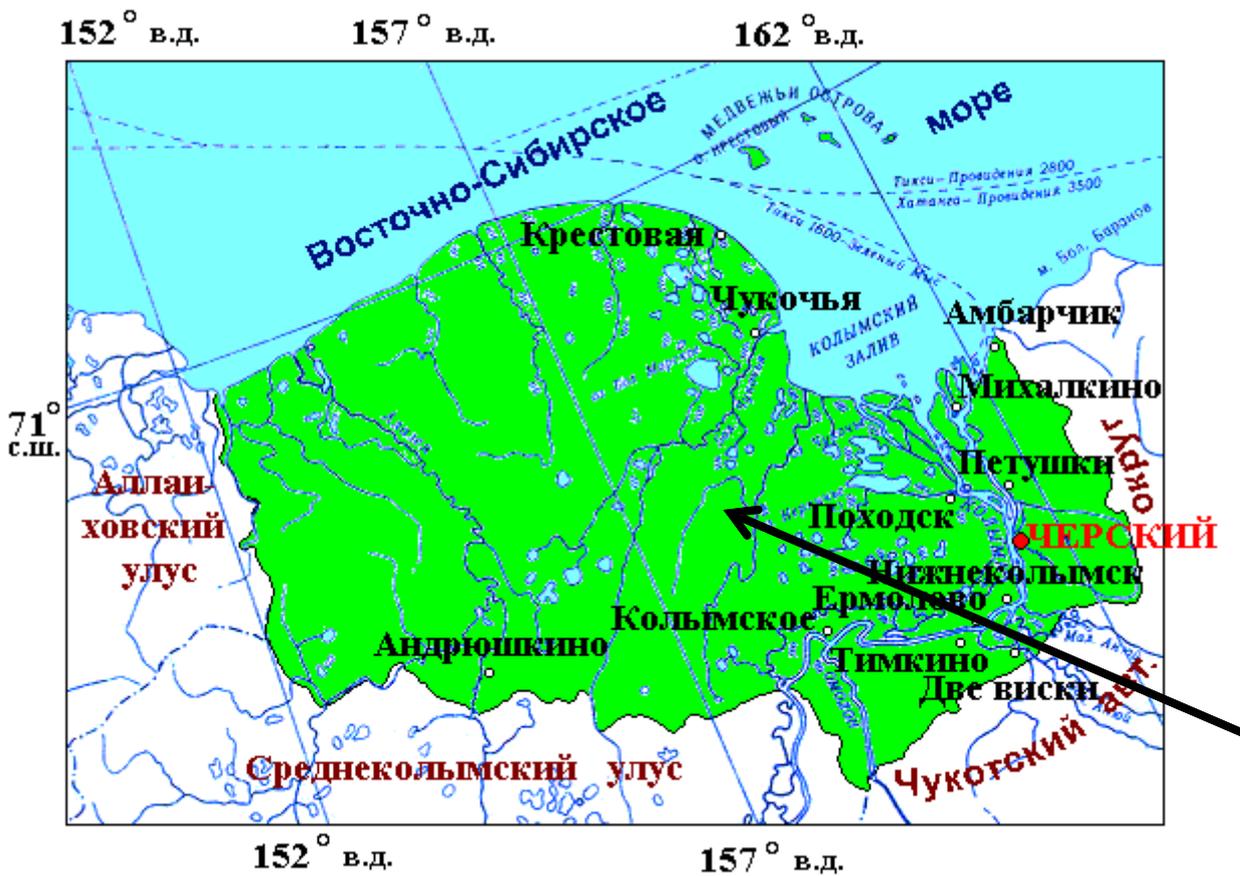


Рис. 1. Карта Нижнеколымского улуса Якутии. Стрелкой указан район на Колымской низменности, где были отобраны пробы для исследований, проведенных в работе.

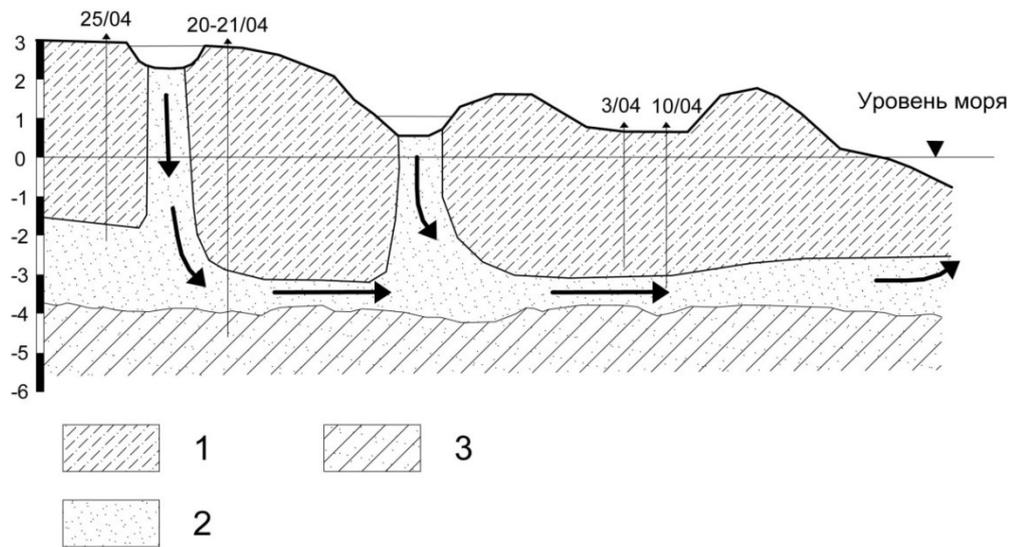


Рис. 2. Схема расположения скважин на участке исследования Варандейского полуострова. 1 – пески прибрежно-морского генезиса; 2 - переслаивание песков и супесей; 3 – супеси морского происхождения.



Рис. 3. Географическое расположение криопэгов, исследованных на полуострове Ямал.



Рис. 4. Район Taglu, дельта р. Маккензи, Канада.

Приложение 2

Таблица 1. Результаты BLAST для последовательностей 16S рРНК в клонных библиотеках.

ОТЕ	Номер GenBank	Общее число клонов %	Ближайший родственник	Сходство, %	Место выделения	Таксономическая принадлежность
KL-16S-OTU0	KF049010	22.1	JQ866672	100	Жемчужная река, Китай	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU1	KF049011	0.2	HQ407458	95	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU2	KF049012	20.0	LN896493	99	озеро Поян, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU3	KF049013	0.2	KJ885382	100	рисовые поля, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26
KL-16S-OTU4	KF049014	8.8	KU297847	100	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II
KL-16S-OTU5	KF049015	0.2	KT964758	98	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU6	KF049016	5.5	KX463148	100	пресные озерные осадка, Дания	<i>Ca.</i> 'Methanoperedens'
KL-16S-OTU7	KF049017	3.1	LN796412	100	грунтовые воды, Нидерланды	<i>Methanosaeta</i> sp.
KL-16S-OTU8	KF049018	2.4	KR066490	100	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Bathyarchaeota</i> (Miscellaneous Crenarchaeotic (MCG) Group)
KL-16S-OTU9	KF049019	0.2	JQ792862	99	болотные арктические почвы, Канада	<i>Altiaarchaeum</i> sp.
KL-16S-OTU10	KF049020	4.0	KT323106	99	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Bathyarchaeota</i> (MCG group)
KL-16S-OTU11	KF049021	0.2	JQ697132	97	сфагновые болота Верховье Волги, Россия	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU12	KF049022	0.5	KU297847	94	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II

KL-16S-OTU13	KF049023	0.5	KU297847	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II
KL-16S-OTU14	KF049024	0.5	JQ079939	97	вулканическое озеро Моноун, Камерун	<i>Ca.</i> ' <i>Methanoperedens</i> '
KL-16S-OTU15	KF049025	0.2	KC604439	97	водохранилище МахOMET, Иллинойс	<i>Ca.</i> ' <i>Methanoperedens</i> '
KL-16S-OTU16	KF049026	0.5	JF789791	99	пресные болотные почвы, США	<i>Bathyarchaeota</i> (MCG)
KL-16S-OTU17	KF049027	0.2	AF225642	95	рисовники, Италия	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26
KL-16S-OTU18	KF049028	0.2	KT964767	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU19	KF049029	0.2	LN795917	98	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU20	KF049030	0.2	KC604439	95	водохранилище МахOMET, Иллинойс	<i>Ca.</i> ' <i>Methanoperedens</i> ' GOM Arc I
KL-16S-OTU21	KF049031	0.2	EF632729	99	пресноводные отложения, Плато Альтиплано, Чили	<i>Methanosaeta</i> sp.
KL-16S-OTU22	KF049032	0.2	AF056362	99	озерo Соянг, Корея	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU23	KF049033	4.8	LN796153	99	грунтовые воды, Нидерланды	<i>Ca.</i> ' <i>Methanoperedens</i> sp.'
KL-16S-OTU24	KF049034	0.2	KJ834210	95	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU25	KF049035	0.5	LN796180	99	грунтовые воды, Нидерланды	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU26	KF049036	0.2	KP203220	99	рисовники, Тайбей, Китай	MBGD and DHVEG-1
KL-16S-OTU27	KF049037	0.2	KJ644923	99	болотные почвы, Сычуань, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26

KL-16S-OTU28	KF049038	0.2	JN397867	96	реки Цзин-Мэй и Синь-Диан, Китай	<i>Ca.</i> <i>'Methanoperedens sp.'</i> GOM Arc I
KL-16S-OTU29	KF049039	0.2	AJ583384	96	грунтовые воды, Сибирь, Россия	<i>Methanosaeta sp.</i>
KL-16S-OTU30	KF049040	0.2	KF360015	98	Тибетское нагорье, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU31	KF049041	0.2	LN796323	99	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-16S-OTU32	KF049042	0.2	LN796016	96	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Ca.</i> <i>'Methanoperedens sp.'</i> GOM Arc I
KL-16S-OTU33	KF049043	0.2	KC604461	97	водохранилище МахOMET, Иллинойс	<i>Methanosaeta sp.</i>
KL-16S-OTU34	KF049044	0.2	DQ869366	94	кислые субарктические торфяные почвы, Сибирь, Россия	<i>Methanosarcina sp.</i>
KL-16S-OTU35	KF049045	0.7	HE796507	100	озеро Muntany	MBGD and DHVEG-1
KL-16S-OTU36	KF049046	3.1	JN649111	100	торфяники, Аппалачи	<i>Methanocella sp.</i>
KL-16S-OTU37	KF049047	1.9	DQ310446	99	река Макензи, Западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU38	KF049048	0.2	DQ310440	99	река Макензи, Западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU39	KF049049	4.0	KM273677	97	рисовники, Италия	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU40	KF049050	1.4	FM165705	94	рисовники, Китай	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-16S-OTU41	KF049051	2.4	EU110047	100	озеро Цинхай, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU42	KF049052	0.2	GQ150034	100	луговые почвы, Тибетское нагорье	<i>Thaumarchaeota</i> , Soil Crenarchaeotic Group
KL-16S-OTU43	KF049053	1.0	JQ724813	99	низкотемпературный источник	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU44	KF049054	1.4	JF412486	98	UASB биореактор	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)

KL-16S-OTU45	KF049055	0.5	KT025831	99	метаногенная накопительная культура	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU46	KF049056	1.0	EU244257	88	река Макензи, западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU47	KF049057	0.2	JQ724807	89	холодный источник	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU48	KF049058	0.5	JN853653	95	озеро Киву, Центральная Африка, 157 м	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU49	KF049059	0.5	JN649253	99	торфяники, Аппалачи	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU50	KF049060	0.2	EU244272	95	река Маккензи Западной Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU51	KF049061	0.2	KT583762	100	пещера Са-Бенту, Сардиния, Италия	<i>Thaumarchaeota</i> , SCG
KL-16S-OTU52	KF049062	0.5	KU297834	99	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , Group C3
KL-16S-OTU53	KF049063	0,2	HQ692929	91	рисовники, Китай	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU54	KF049064	0.2	DQ310443	98	река Маккензи, Западной Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU55	KF049065	0.2	EF639571	99	озеро Пончартрейн, США	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU56	KF049066	0.2	LN796333	96	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Ca. 'Methanoperedens', GOM Arc I</i>
KL-16S-OTU57	KF049067	0.2	JN853653	93	озеро Киву, Центральная Африка, глубина 157 м	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU58	KF049068	0.2	EU244257	90	озеро Маккензи, Австралия	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU59	KF049069	0.2	KF800016	97	Тибетское нагорье	<i>Methanosaeta</i> sp.

Таблица 2 . Результаты BLAST для последовательностей *mcrA* генов клоновых библиотек.

ОТЕ	Номер GenBank	Ближайший родственник	Сходство, %	Источник выделения	Таксономическая принадлежность
KL- <i>mcrA</i> -OTU0	AGU01548	ADY16721	99	лесные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU1	AGU01549	ALB48939	99	подледниковые отложения, Восточная Антарктида	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU2	AGU01550	AIB53924	99	термокарстовый пруд, сфагновый торф	<i>Methanobacterium</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU3	AGU01551	ARO50374	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanobacterium</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU4	AGU01552	AHB61232	99	ручей, Чехия	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU5	AGU01553	ADY16721	99	лесные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU6	AGU01554	CCG47729	98	альпийские почвы	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU7	AGU01555	ABX75055	99	Тибетское нагорье	<i>Ca. Methanoperedens</i> sp.!
KL- <i>mcrA</i> -OTU8	AGU01556	CCU55320	97	Морские осадки	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU9	AGU01557	AGC53983	100	осадки, Китай	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU10	AGU01558	ACF16854	97	осушенные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU11	AGU01559	AHG52768	100	анаэробный биореактор	<i>Ca. Methanoperedens</i> sp.!
KL- <i>mcrA</i> -OTU12	AGU01560	AGS51105	96	гуминовые озерные осадки, озеро Роуз	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> -OTU13	AGU01561	AGC54162	99	осадки, Китай	<i>Methanocellales</i>
KL- <i>mcrA</i> -OTU14	AGU01562	AGS51092	96	гуминовые озерные осадки, озеро Роуз	<i>Methanoregula</i> sp.

KL- <i>mcrA</i> - OTU15	AGU01563	AHB61233	97	ручей, Чехия	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU16	AGU01564	ACF16854	94	осушенные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU17	AGU01565	CCG47729	96	альпийские почвы	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU18	AGU01566	AFI42263	98	осадки эстуария	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU19	AGU01567	AGC54162	99	осадки, Китай	<i>Methanocella</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU20	AGU01568	ALF38207	99	озерные осадки	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU21	AGU01569	ALT20348	96	торфяные почвы таежных лесов	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU22	AGU01570	AGS50916	97	гуминовые озерные осадки, Mary Lake, США	<i>Methanoregulaceae</i>
KL- <i>mcrA</i> - OTU23	AGU01571	AGS50710	95	гуминовые озерные осадки, Mary Lake, США	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU24	AGU01572	ANG52768	99	анаэробный биореактор	Ca. ' <i>Methanoperedens</i> sp.'
KL- <i>mcrA</i> - OTU25	AGU01573	CCU55320	97	морские осадки	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU26	AGU01574	ABX75059	99	Тибетское нагорье	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU27	AGU01575	ACY40858	99	гуминовые озерные осадки	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU28	AGU01576	ANY00248	97	водохранилище с высокой концентрацией мышьяка	Ca. ' <i>Methanoperedens</i> ' sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU29	AGU01577	AAK16840	99	рисовники, Китай	Ca. ' <i>Methanoperedens</i> ' sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU30	AGU01578	AAK16840	98	рисовники, Китай	Ca. ' <i>Methanoperedens</i> ' sp.

KL- <i>mcrA</i> - OTU31	AGU01579	АНУ02462	99	пресноводные болота, Китай	<i>Methanobacterium</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU32	AGU01580	ССГ47729	95	альпийские почвы	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU33	AGU01581	АНВ61234	96	ручей, Чехия	<i>Methanosaeta</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU34	AGU01582	АГС51082	97	гуминовые осадки, озеро Роуз	<i>Methanoregula</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU35	AGU01583	АЛС46627	98	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	Ca. ' <i>Methanoperedens</i> ' sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU36	AGU01584	АНУ02668	100	пресноводные болота, Китай	<i>Methanocella</i> sp.
KL- <i>mcrA</i> - OTU37	AGU01585	АНУ02462	99	пресноводные болота, Китай	<i>Methanobacterium</i> sp.

Приложение 3.

Состав жирных кислот клеточных стенок

Таблица 1. Профили жирных кислот клеточных стенок выделенных штаммов и близкородственных видов рода *Clostridium*.

Виды: 1, *C. tagluense* A121^T; 2, *C. algorithilum* 14D1^T; 3, 14F^T; 4, *C. bowmanii* DSM 14206^T; 5, *C. frigoris* DSM 14204^T; 6, *C. lacusfrixellense* DSM 14205^T; 7, *C. psychrophilum* DSM 14207^T; 8, *C. estertheticum* DSM 8809^T. Данные для сравнения взяты из Spring et al., 2003, for 5-9. Значения даны в процентах от общего содержания жирных кислот. Основные жирные кислоты (>5%) выделены жирным шрифтом. Условные обозначения: cyc, циклопропан; dma, диметилацеталь.

Соединения	1	2	3	4	5	6	7	8
C 14:1 ω 7	1.2	-	-	-	-	-	-	-
C 14:1 ω 5	0.5	1.4	0.3	0.3	-	0.2	0.7	-
C 14:0	10.4	32.6	37.9	19.7	17.2	17.8	19.5	28.4
C 15:0	1.0	-	-	-	-	-	-	-
C 15:0 dma	1.5	-	-	-	-	-	-	-
C 15:1 ω 8	1.0	-	-	-	-	-	-	-
C 16:0	15.0	6.6	9.9	12.7	11.1	5.7	9.2	8.6
C 16:0 dma	1.6	-	-	0.5	-	0.3	0.3	-
C 16:1 ω 5 dma	1.0	-	-	-	-	-	-	-
C 16:1 ω 9	5.5	37.0	1.3	6.5	4.7	8.8	3.0	3.6
C 16:1 ω 9 dma	3.0	-	-	2.7	1.3	2.9	1.3	1.4
C 16:1 ω 7	18.8	-	9.7	25.4	26.5	30.7	25.7	11.5
C 16:1 ω 7 dma	22.0	12.5	20.6	16.3	21.1	21.5	17.3	22.1
C 16:1 ω 5	7.7	-	5.2	8.9	8.7	5.6	10.0	7.0
C 17:0 cyc	-	0.6	6.0	-	-	-	1.3	4.3
C 17:0 cyc dma	-	-	-	-	-	-	1.0	3.4
C 17:1 dma	-	-	9.4	-	-	-	-	-
C 18:0	-	1.5	-	0.3	1.1	0.3	1.2	-
C 18:1 ω 9	0.7	0.6	-	0.6	0.8	0.7	1.7	0.7
C 18:1 ω 9 dma	-	0.6	-	0.1	-	0.4	0.9	0.5
C 18:1 ω 7	1.5	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 2. Состав жирных кислот клеточных стенок штаммов GLS2^T и Buddy^T.

Обозначения: ALDE, альдегид; DMA, диметил ацеталь; 2-ОН, 2-гидрокси, 3-ОН, 3-гидрокси.

Соединения	GLS2 ^T	Buddy ^T
C _{14:0}	10.5	6.4
3ОН C _{14:0}	2.0	1.1
C _{14:0} DMA	2.7	5.5
C _{14:0} сумма	15.2	13.0
C _{16:0}	14.3	3.6
3-ОН C _{16:0}	16.9	15.2
C _{16:0} ALDE	2.1	3.6
C _{16:0} DMA	20.1	20.7
C _{16:0} сумма	53.4	43.1
C _{16:1n8c}	2.5	0.0
C _{16:1n8t}	12.4	4.7
C _{16:1} ALDE	2.0	1.9
C _{16:1n8c} DMA	1.0	1.3
C _{16:1n8t} DMA	6.5	11.7
C _{16:1} сумма	24.4	19.6
2-ОН C _{18:0}	0.0	2.3
C _{18:0} DMA	0.0	1.1
C _{18:0} сумма	0.0	3.4
C _{18:1n9c}	0.9	1.5
C _{18:1n9t}	2.0	3.2
C _{18:1} DMA	0.0	10.8
C _{18:1} сумма	2.9	15.5
C _{20:4n6}	0.0	1.8
Сумма жирных кислот	95.9	96.4

Таблица 3. Профили жирных кислот штаммов C7^T и *Celerinatantimonas diazotrophica* S-G2-2^T

Соединения	<i>C. yamalensis</i> C7 ^T	<i>C. diazotrophica</i> * S-G2-2 ^T
C _{12:0}	0.5	4.1
C _{14:1ω5}	0.7	-
C _{14:0}	1.0	2.1
C _{14:0 3OH}	2.0	
Суммарное значение:	-	13.4
C _{12:0ald} и/или неизв. жирная кислота и/или <i>iso</i> -C _{16:1 I} /C _{14:0 3-OH}		
C _{16:1 ω 7c}	25.2	-
C _{16:1 ω 7t}	0.3	-
Суммарное значение:	-	
C _{16:1ω7c} /C _{16:1ω6c}		18.2
C _{16:1 ω 5c}	-	0.1
C _{16:0}	37.1	35.5
C _{9Me16:1}	1.2	-
C _{17cyc}	14.7	6.8
Суммарное значение:	-	0.3
C _{18:2ω6,9c/anteiso} -C _{18:0}		
C _{18:1 ω 7c}	15.9	-
Суммарное значение:	-	14.9
C _{18:1 ω 7c} и/или C _{18:1ω6c}		
C _{11Me 18:1 ω 7c}	-	0.5
Суммарное значение:	-	0.4
C _{19:1ω7c} /C _{19:1ω6c} и/или C _{19:1ω6c} /ω7c/C _{19:0 cyc} и/или C _{19:0 cyc ω10c} /C _{19:1ω6}		
C _{18:0}	0.7	-
C _{19cyc}	0.7	-
C _{19:0cyc ω 8c}	-	3.0
C _{19:0}	-	0.2

*Данные из Cramer et al., 2011

Таблица 4. Состав жирных кислот клеточных стенок штаммов B15^T, *D. idahonensis* CY1^T и K3S^T.

Соединения	B15 ^T	<i>D. idahonensis</i> CY1 ^T	K3S ^T
C _{i14}	1.0	1.0	-
C _{14:0}	1.0	3.0	2.1
C _{i15}	6.0	7.6	0.6
C _{a15}	12.4	16.7	8.2
C _{15:0}	1.3	0.6	-
C _{i16:1}	6.1	6.0	-
C _{a16:1}	-	-	-
C _{i16}	6.3	6.5	-
C _{16:1} ω7c	25.1	11.8	62.1
C _{16:1} ω5c	0.7	-	4.8
C _{16:0}	20.2	18.7	19.1
3OH-C _{i15}	0.6	0.8	-
C _{br17:1}	-	-	-
C _{i17:1} ω7	9.4	12.0	1.4
C _{i17}	0.7	3.1	-
C _{a17}	0.7	1.1	-
C _{17:1} ω9	1.3	0.5	-
C _{17:1} ω11	1.3	1.0	-
C _{17:0}	2.4	1.7	-
C _{17cyc}	-	-	-
C _{18:1} ω7	3.3	3.3	2.6
C _{18:1} ω7c	-	-	-
C _{18:0}	1.2	1.6	-