

Щербакова Виктория Артуровна

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

Специальность: 03.02.03 - Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва - 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН), г. Пущино.

**Официальные
оппоненты:**

Земская Тамара Ивановна,
доктор биологических наук, заведующая лабораторией
микробиологии углеводородов Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Лимнологический институт Сибирского отделения
Российской академии наук

Карначук Ольга Викторовна,
доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой
физиологии растений и биотехнологии Федерального
государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»

Петрова Майя Александровна,
доктор биологических наук, заведующая сектором анализа и
хранения микроорганизмов Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт молекулярной
генетики Российской академии наук

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского
отделения Российской академии наук

Защита состоится 17 октября 2018 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2018 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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 позднеледникового ледового комплекса (едома), широко распространенного как в Сибири, так и на Аляске, содержащего около 400 гигатонн 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; Koven et al., 2011; Graham et al., 2012).

Возрастающий интерес к микроорганизмам - обитателям экстремальных экосистем объясняется также уникальностью свойств этих бактерий и архей, часто находящихся 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, 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, Гоготова, 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 & Jorgensen, 2013). Поэтому 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.

Состояние проблемы

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). Проведенные исследования показали, 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 - криопэгов. 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 связи с угрозой глобального потепления и, как следствие, 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 Anthony et al., 2010; Tas et al., 2014; Allan et al., 2014; Schädel et al., 2016). Немецкие ученые исследовали микробное разнообразие морских мерзлых осадков в дельте реки Лена (море Лаптевых, Россия) и описали новый вид метаногенов, *Methanosarcina soligelidi*, выделенный из сезонно-талого 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. Показано, что бинарная метанообразующая 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 (ВКМ) 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, Пущино; 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 Biogeographical 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 Пущинских 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 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. Скрябина 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 г.г.) 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. Абашинной. 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. Структуру полисахаридов устанавливали в ИОХ РАН совместно с к.б.н. А.Н. Кондаковой. На отдельных этапах в работе принимали участие сотрудники ИБФМ РАН к.б.н. Н.А. Чувильская, к.б.н. Печерицына С.А., асп. Суетин С.В., к.б.н. К.С. Лауринавичюс, к.б.н. С.М. Трутко, 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 249 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования: 1. Образцы многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (Россия), отобранные Д.А. Гиличинским (лаборатория криологии почв, ИФХиБПП РАН) и долины р. Маккензи, Канада, переданные нам Д.А. Гиличинским. 2. Образцы криопэгов, отобранные в районе оз. Якутское (Колымская низменность) Д.А. Гиличинским в 1999 году; на п-ове Варандей, отобранные в 2004 г. А.Л. Холодовым (ИФХиБПП РАН); на п-ове Ямал, отобранные в 2013 году Н.Э. Демидовым (ИФХиБПП РАН). 3. Чистые культуры и ассоциаты бактерий и архей, выделенные нами из этих образцов. Для сравнительного анализа использовали референтные штаммы бактерий и архей, полученные из ВКМ или DSMZ: Для сравнительного анализа использовали штаммы микроорганизмов *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* B-1799^T, *Clostridium frigidum* BKM B-2735^T, *C. lacusfryxellense* VKM B-2736^T, *C. bowmanii* VKM B-2737^T, *C. psychrophilum* VKM B-2738^T, *C. estertheticum* VKM B-2739^T и *Psychrobacter nivimaris* DSM 16093^T.

Таблица 1. Характеристика образцов многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, использованных в работе.

Образец	Глубина, м	Возраст, лет*	Содержание Сорг, %	СН ₄ , мм кг ⁻¹	δ ¹³ СН ₄ , ‰**
KL50	0.50-0.55	н.о.	4.1	0.035	н.о.
KL400	4.0-4.1	н.о.	1.5	0.648	-72
KL1450	14.5-14.6	н.о.	0.8	0.313	-88
KL1750	17.5-17.6	23800±170	0.27	0.104	-85
KL2200	22.2-22.3	30700±390	0.34	0.503	-95
14/99	27.35-27.40	100-120 тыс.	0.31	н.о.	н.о.
15/99	24.15-24.20	100-120 тыс.	0.25	н.о.	н.о.
16/99	10.0	5 000	0.9	н.о.	н.о.
1/98	40.0	3 млн	0.28	н.о.	н.о.

KL, Колымская низменность; н.о., не определяли; *данные Краев *et al.*, 2013; ** Ривкина *и др.*, 2006

Отбор проб грунта для микробиологического анализа осуществляли согласно ранее отработанной методике (Shi *et al.*, 1997). До начала анализов в лаборатории все образцы хранили в замороженном состоянии (-10°C).

Таблица 2. Характеристика исследованных образцов криопэггов.

№ скважины	Глубина отбора, м	pH	Минерализация, г/л	Катионы				Анионы			
				K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	
Колымская низменность											
14/99	28	7.4	163.0	0.8	48.8	1.6	8.0	0.6	99.4	3.84	
15/99	25	7.3	156.9	0.8	47.4	1.2	7.7	0.5	97.3	1.92	
Полуостров Варандей											
21/04	9	7.4	9.3	0.7	0.03	1.01	1.0	2.1	3.6	0.92	
Полуостров Ямал											
1Y	120.0	7.9	14.6	0.1	0.2	2.0	2.0	0.5	9.6	0.19	
2Y	5.0	7.4	56.2	0.9	16.4	0.52	2.4	1.0	31.2	2.88	
3Y	12.5-20.0	7.5	77.2	0.4	22.7	1.04	3.8	1.7	47.2	0.31	

Отбор газа из образцов многолетнемерзлых пород в полевых условиях осуществляли методом „head space” (Rivkina *et al.*, 2007) путем дегазации в 150 мл шприцах. Газ из шприцов компенсационным методом переводился во флаконы в полевых условиях. Характеристика образцов мерзлых грунтов и криопэггов приведены в таблицах 1 и 2.

Учет численности представителей различных физиологических групп микроорганизмов осуществляли на селективных средах для анаэробных гетеротрофов, сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ), ацетогенов и метанобразующих архей с применением метода предельных разведений. Культивирование осуществляли при температурах 5-6 и 15-18°C. Общий счет определяли на фильтрах по Разумову (1962).

Для получения и культивирования **накопительных и чистых культур** метаногенных архей и анаэробных бактерий руководствовались анаэробной техникой (Hungate, 1969) и использовали основную минеральную среду (Balch *et al.*, 1979). Для выделения чистых культур использовали метод десятикратных разведений на соответствующей каждой культуре среде.

Морфологию клеток и контроль чистоты культур изучали с использованием световых микроскопов с фазовым контрастом Люмам И-2 (Россия) и Zeiss Axiostar plus (Германия), а также электронного микроскопа JEM-100B (Япония). Препараты для электронно-микроскопических исследований готовили по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

Физиолого-биохимические свойства изолятов изучали по общепринятым методикам (Герхард и др., 1984; Powell, 1983; Boone and Whitman, 1988) и с использованием экспресс-тестов API (BioMerieux, Франция). Влияние перхлоратов на рост метаногенов оценивали путем определения изменения скорости образования метана из $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ и ацетата в присутствии NaClO_4 или $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$.

Определение десульфовиридина проводили по методике Постгейта (Postgate, 1959). Содержание **летучих жирных кислот, спиртов и метана** определяли на газовом хроматографе Pye-Unicam 304 (Великобритания) или хроматографе ХПМ.4 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Определение **водорода** осуществляли на газовом хроматографе Shimadzu 8A с теплопроводным детектором. Содержание **глюкозы** определяли по методу Шомодьи-Нельсона (1944). Содержание **лактата** в среде определяли ферментативным способом (Hohorst, 1970). Концентрацию ионов в культуральных средах измеряли: **сульфид** - по методу, предложенному Пахмайером (Cline, 1969), **Fe^{2+}** определяли согласно Лавли (Lovley *et al.*, 1986). **Содержание белка** определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) после предварительного гидролиза клеток. Выделение и определение **липидов** проводили в соответствии с методикой Минникина (Minnikin *et al.*, 1979). Биомассу для анализа **жирнокислотного состава клеток** обрабатывали согласно инструкциям Microbial Identification system (Sasser, 1990). Полученные экстракты эфиров жирных кислот анализировали с помощью хроматографической системы Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II GC-MS. при температурном режиме колонки от 120 до 300°C. Концентрацию **перхлоратов** определяли на хроматографе IC-2010 (Токио, Япония). Ингибирующую активность перхлоратов выражали в процентах от контрольной скорости (%СК). Процент ингибирования (%ИК) рассчитывали следующим образом: $\% \text{ИК} = 100 - \% \text{СК}$. **Липазную активность** в клеточных экстрактах бактерий и архей определяли с использованием Lipase Assay Kits (Bio Assay Systems, UK). Определение **антифризной активности** культур основывалось на визуальном определении прозрачности кристаллов после быстрого замораживания клеточных гомогенатов и культуральной жидкости при понижении температуры с использованием модуля, снабженного стеклянным столиком с контролем температуры (Model THM 600, Linkham Scientific Instruments, UK).

Внутриклеточный полисахарид выделяли по методу Стамса (1983), элементный состав (С, Н, N) определяли на приборе для элементного анализа модель 1106 («Carlo Erba Strumentazione», Италия).

Молекулярно-генетические методы. ДНК из образцов многолетнемерзлых отложений выделяли с помощью набора Power Soil DNA (MoBio, США) согласно протоколу производителя. Выделение и очистку хромосомной ДНК чистых культур микроорганизмов проводили модифицированным методом Мармура (Marmur, 1961). Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoPhotometer®P-Class (Implen, Германия). Амплификацию генов осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). Создание клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcrA* проводили при помощи клонирования соответствующих ПЦР продуктов с использованием набора QIAEX II Gel (Qiagen, Hilden, Германия).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и функциональных генов проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН и Институте полярных исследований (г. Токио, Япония) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК 3730 Applied Biosystems. Секвенирование и аннотация геномов проводились в рамках проекта «Genomic Encyclopedia of Type Strains, Phase III (KMG-III)» в DOE Joint Genome Institute в США. Филогенетические дендрограммы были построены с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura et al, 2013), с применением метода «neighbor-joining» (Saitou et al, 1987), если не указано иначе. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов JL01, GSL2^T, МК4^T, М2^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^T депонированы в GenBank под номерами KY368727 и JF701923, соответственно. В эту же базу данных помещены последовательности клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcrA* под номерами KF049010-KF049107. Содержание Г+Ц пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Owen et al., 1985; Mesbah et al., 2011). Реакцию ДНК-ДНК гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora с соавт. (2011). ДНК-ДНК гибридизацию *in silico* осуществляли с применением программного обеспечения GGDC 2.0 на сайте DSMZ.

Статистический анализ последовательностей проводили по методике (Good, 1953; Chao, 1987). Индексы видовой разнообразия Шеннона (H) и доминирования Симпсона (D) определяли с использованием программного обеспечения «Shannon and Chao 1 index RBD» (Cole et al, 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 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 et al., 2002). Линзы рассолов (криопэги), обнаруженные в вечной мерзлоте, являются уникальным объектом на Земле, характеризующимся постоянной отрицательной температурой и находящиеся при этом в жидком состоянии. Это обусловлено высокой соленостью криопэгов, которые образовались в результате промерзания морских осадков. В работе были исследованы криопэги, расположенные в районе оз. Якутское на Колымской низменности, распресненный криопэг п-ва Варандей и три криопэга па п-ве Ямал.

1. Численность анаэробных прокариот различных физиологических групп в вечной мерзлоте и криопэгах

Колымская низменность. Общая численность микроорганизмов в самых минерализованных из исследованных криопэгов, определенная путем прямого счета, составила 2.3 - 6.6×10^7 кл/мл. Численность жизнеспособных аэробных бактерий колебалась от 0 до сотен тысяч клеток в 1 мл рассола.

Таблица 4. Численность анаэробных жизнеспособных прокариот различных физиологических групп в образцах криопэгов.

№ 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	5.0	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	9.0	$3.5 \times 10^{8*}$	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										
1У	15.0	8.2×10^8	2×10	2×10^8	2×10^4	2×10^3	0	10	0	0
2У	40.0	4.2×10^7	2×10^3	2×10^5	0	10	0	2×10^2	2×10^2	0
3У	40.0	3.2×10^6	2×10^4	2×10^5	2×10^3	2×10^3	2×10	2×10	2×10	0

*- сульфатвосстанавливающие бактерии

Численность анаэробных прокариот различных физиологических групп была определена в скважинах 14/99 и 15/99 (Табл. 3) и составила от десятков (ацетогены) до нескольких миллионов (сульфатредукторы) клеток в 1 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. 4). Галофильные гетеротрофы, ацетогены и метаногены обнаружены не были. Методически трудно получить образцы криопэгов без попадания в рассол некоторой части мерзлого грунта скважины. Поэтому мы провели подсчет численности таких же групп анаэробов в образцах мерзлой породы, находящейся над исследованными криопэгами (табл. 4.) 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.

Таблица 4. Численность анаэробных микроорганизмов в пробах вечной мерзлоты над криопэгами.

№ сква- жины	Глубина, м	Температура инкубации, °C	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.

Варандейский полуостров. Вода распресненных криопэгов 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 TSA, 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°C, на 1-3 порядка ниже ($1.1 \times 10^3 - 5.5 \times 10^5$ кл/мл), чем при 5 и 20°C ($4.5 \times 10^6 - 3.5 \times 10^7$ и $8 \times 10^5 - 4 \times 10^7$, 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 (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. Количество микроорганизмов, определенное путем прямого счета, составило 3.5×10^8 кл/мл и было 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. 4). 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 меньше, чем количество бактерий, полученное при посеве на пресные среды (табл. 3).

Криопэги Ямала. 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 количественной ПЦР (qPCR) с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f/1492r на ген 16S рНК. 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. 5). Для определения общего количества СВБ использовали метод предельных разведений (МПП) и qPCR с применением стандартной пары праймеров DSR1F/DSR4R (Wagner et al., 1998) на функциональный ген бисульфитредуктазы *dsrAB*. 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 соответствовал данным, полученным МПП (табл. 5).

Таблица 5. Общая численность бактерий и сульфатредукторов в криопэгах Ямала.

Криопэг	Минерализация, г/л	Общая численность бактерий		Общая численность СВБ	
		МПС*, кл/мл	qPCR**, копий гена/мл	МПП***, кл/мл	qPCR, 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	56.2	4.2×10^7	н.о.	0	0
3Y	77.2	3.2×10^6	1.2×10^7	2×10^2	2.7×10^2

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

Таким образом, микробиологический анализ высокоминерализованных криопэгов Колымской низменности, распресненных криопэгов Варандейского и находящихся на промежуточной позиции криопэгов полуострова Ямал, показал, что обитателями этих экосистем являются психрофильные галотолерантные сообщества. Сравнение первых двух экосистем показало, что полная изолированность Колымских криопэгов от влияния внешних факторов, привела к преобладанию анаэробных микроорганизмов в то время как в молодые Варандейские криопэги с пресными поверхностными водами периодически поступает кислород и мы обнаружили больше аэробов, чем анаэробов. В целом, по данным общего счета, менее соленые и более теплые криопэги населяют более многочисленные микробные популяции. При анализе распространения бактерий в криопэгах Ямала нами был применен метод количественной ПЦР, который позволил также определить численность сульфатредукторов – важной функциональной группы для микробных сообществ криопэгов в виду их морского происхождения.

2. Разнообразие архей в вечной мерзлоте Арктики

В 2002 году были получены данные о биогенном образовании метана в образцах вечной мерзлоты при отрицательных температурах (Ривкина и др., 2002), однако

оставался открытым вопрос о существовании природных низкотемпературных прокариотных сообществ, в которых на терминальной стадии разложения органического вещества может образоваться метан.

Для оценки разнообразия архей, в том числе метаногенов, были отобраны образцы вечной мерзлоты Арктики, содержащие биогенный метан возрастом до 32 тыс. лет (табл. 1.). В результате амплификации общей ДНК, выделенной из каждого образца, с универсальными архейными праймерами на ген 16S рРНК и последующим клонированием, были созданы пять клоновых библиотек, объем выборки которых составил от 81 до 88 клонов с покрытием от 70 до 93% (Табл. 6.).

Таблица 6. 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>	16S рРНК	<i>mcrA</i>	16S рРНК	<i>mcrA</i>	16S рРНК	<i>mcrA</i>	16S рРНК	<i>mcrA</i>
Размер библиотеки	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	3.55	1.52	3.05	3.80	1.39	1.15	2.76	1.44	3.42	2.07

Выборка библиотеки клонов, полученных амплификацией с праймерами на ген α -субъединицы метилкоэнзим М редуктазы (*mcrA*), который обнаружен у всех метаногенов, составила от 43 до 59 клонов, представляющих 37 филоотипов. В каждом образце мерзлого грунта были обнаружены от 3 до 23 таксономических групп архей. Покрытие составило 59-95%, что выше средних значений, необходимых для достоверной характеристики разнообразия в библиотеках клонов. В полученных библиотеках доминантным (57-93% 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 группы метанобразующих архей: ацетокластических метаногенов, относящихся к родам *Methanosarcina* и *Methanosaeta* порядка *Methanosarcinales* и водородиспользующих метаногенов родов *Methanoregula* и *Methanocella*, относящихся к порядкам *Methanomicrobiales* и *Methanocellales*. Филоотип *Ca. 'Methanoperedenaceae'* (Haroony *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015) порядка *Methanosarcinales* был обнаружен в четырех из пяти образцов и имел сходство по 16S рРНК с семью филоотипами, три из которых относились к родственной филогенетической группе *Methanoregulaceae* порядка *Methanomicrobiales* (рис. 1 А.). В дополнение к метаногенам, в образцах KL50, KL400, KL2200 присутствовал минорный филоотип (1.2-2.5% клонов), относящийся к порядку

Thermoplasmata, который включал представителей группы MBG-D (KL-16S-OTU35 и KL-16S-OTU26).

Две ветви *Thaumarchaeota* объединяли три филотипа, на генном уровне относящихся к C3 и SCG архейным группам и ближайшим родственникам рода *Nitrososphaera* (Steiglmeier *et al.*, 2014). Филогенетическая группа *Woesearchaeota* (бывшая архейная группа DHVEG-6) включала 11 филотипов, большинство из которых были обнаружены в образце KL2200 (рис. 1 А).

Анализ последовательностей 16S рРНК гена показал, что 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, филотип KL-16S-OTU0 (22.1% общего числа клонов), чьим близким родственником оказался вид *Methanoregula formicica* (97% сходства), был идентичен филотипу, полученному из образцов осадков устья Жемчужной реки в Китае на глубине 1.5 м (Chen *et al.*, 2014). Вторая большая группа клонов (8.8%), относящаяся к филотипу KL-16S-OTU4, представляла новое семейство порядка *Methanomicrobiales* и включала последовательности, полностью совпадающие с последовательностями, обнаруженными в образцах мерзлых отложений Цинхай-Тибетского нагорья (Китай).

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 филотипа *Ca.* 'Methanoperedenens sp.' (KL-*mcrA*-OTU11) полностью совпала с последовательностью, полученной из образца анаэробного биореактора (Приложение 2, табл. 2).

Последовательности гена *mcrA*, полученные в нашем исследовании, были отнесены к классам *Methanobacteria* и *Methanomicrobia* (табл. 7). Доминирующим оказался класс *Methanomicrobia*, который, в свою очередь, включал филотипы, представляющие порядки *Methanocellales* (3 ОТЕ), *Methanomicrobiales* (9 ОТЕ) и *Methanosarcinales* (16 ОТЕ). В образце KL1750 (рис. 1 Б) были обнаружены только 4 филотипа, все относящиеся к *Ca.* 'Methanoperedenaceae' порядка *Methanosarcinales* (табл. 7). В то время как в клонированной библиотеке по гену 16S рРНК для этого образца метаногенные филотипы были представлены кроме *Ca.* 'Methanoperedenaceae' еще представителями родов *Methanocella* и *Methanosarcina* (табл. 7). Такие расхождения, возможно связаны с различной специфичностью праймеров, использованных в работе.

Таким образом, обнаруженные метаногенные археи относились к представителям порядков *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*. Семь филотипов порядка *Methanosarcinales* были идентифицированы как представители ранее предложенного семейства *Ca.* 'Methanoperedenaceae'. В настоящее время данное семейство не имеет культивируемых представителей, но 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 (Haroon *et al.*, 2013).

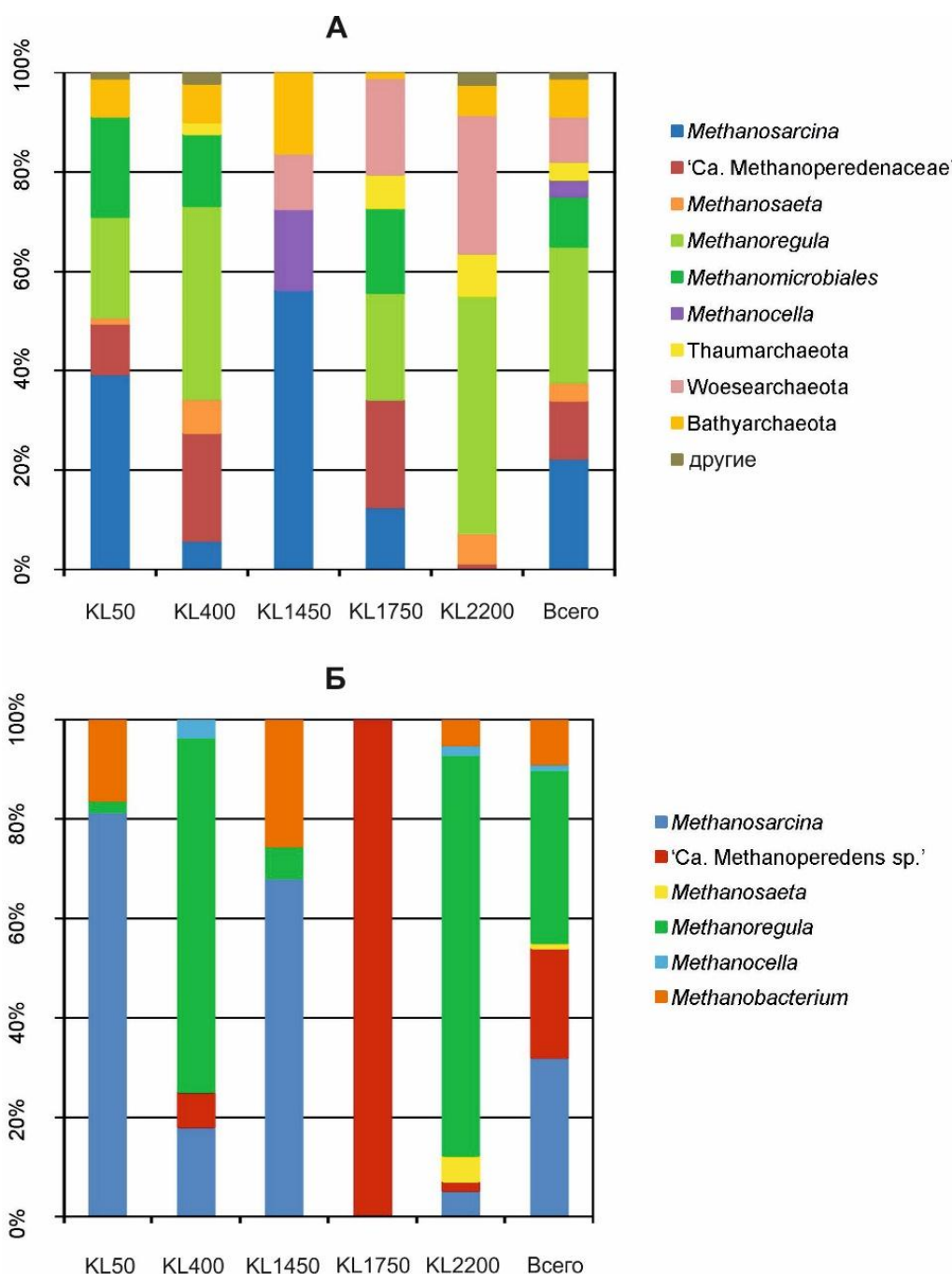


Рис. 1. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов 16S рРНК (А) и *mcrA* (Б) архей из исследованных образцов многолетнемерзлых пород.

Исследование разнообразия архей микробных сообществ пяти арктических метан-содержащих образцов вечной мерзлоты различного возраста с использованием молекулярно-экологических приемов показало, что во всех образцах присутствовали археи различных филумов, преимущественно представители *Euryarchaeota*. Обнаруженные метаногенные филотипы относились к порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*. 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 1000 клеток в г породы (Ryzhmanova *et al.*,

2010). 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.

Таблица 7. 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. 'Methanoperedenaceae'</i>	3	4		1	1		2		4	1
<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

3. Анаэробные и факультативно-анаэробные прокариоты из мерзлых грунтов и криопэггов

3.1 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.

Клетки штаммов A121^T, 14D1^T и 14F^T имели типичную структуру для бактерий рода *Clostridium* и окрашивались по Граму положительно. Штамм A121^T был

представлен неподвижными прямыми палочками шириной 1.0 - 1.2 мкм и длиной 3-10 мкм, с закругленными концами, образующими терминальную спору (рис. 2, А, Б). Клетки штамма 14D1^T представляли собой подвижные прямые палочки с закругленными концами, подвижные за счет перитрихиально расположенных жгутиков (рис. 2, В). Сферические эндоспores образовывались обычно в центре клетки или субтерминально, не раздувая клеточную стенку. Ультратонкие срезы спорулирующих клеток (рис. 2, Г) показали, что споры штамма 14D1^T имели строение, типичное для представителей *Firmicutes*. Клетки штамма 14F^T представляли собой прямые с закругленными концами неподвижные палочки, одиночные или в парах. Сферические (рис. 2, Д) эндоспores образовывались обычно субтерминально и терминально. Исследования ультратонких срезов подтвердили наличие клеточной стенки грамположительного типа, но снаружи помимо муреинового находился еще один электронплотный слой, по-видимому, микрокапсула (рис. 2, Е). Основные фенотипические свойства штаммов А121^T, 14D1^T и 14F^T представлены в описании видов.

Нами были получены большие фрагменты нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штаммов А121^T (1454 п.о.), 14D1^T (1481 п.о.) и 14F^T (1388 п.о.). Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что новые арктические изоляты клостридий объединяются с антарктическими видами и двумя подвидами *C. estertheticum*. На филогенетическом дереве ближайшими соседями новых штаммов являются *C. frigoris*, *C. lacusfryxellense*, *C. bowmanii*, *C. psychrophilum* и *C. estertheticum* со сходством от 98.0 до 99.6 % (рис. 3). Уровень ДНК-ДНК гибридизации штаммов между собой и близкородственными видами не превышал 52%. 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 мы предложили три новых вида клостридий: *Clostridium algoriphilum* (Shcherbakova *et al.*, 2005), *Clostridium tagluense* (Suetin *et al.*, 2009) и *Clostridium frigoriophilum*.

***Clostridium tagluense* sp.nov.** (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 А121^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. Эндоспores сферические - слегка эллипсоидные и расположены субтерминально. 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 ростом при рН 6.8-7.2. В оптимальных условиях время удвоения составляет 12.7 часа. Помимо пептона и дрожжевого экстракта, использует фумарат, малат, триптиказу, бетаин, холин, D-глюкозу, мальтозу, фруктозу, трегалозу. Сбраживание пептона и дрожжевого экстракта приводит к образованию бутирата, ацетата, валерата, этанола, H₂ и СО₂. Гидролизует желатину и не гидролизует крахмал. В пептидогликане клеточной стенки содержится мезо-диаминопимелиновая кислота. Основными жирными

кислотами клеточной стенки являются C_{16:1ω7}, 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.

***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°C, верхний предел роста 20°C. pH 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, мио-инозитол сорбит, галактозу, мальтозу, D-глюкозу, арабинозу, маннозу, сахарозу, рибозу, маннит, D-фруктозу, рафиннозу, мелибиозу, 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, H₂ и CO₂. Пептидогликан содержит мезо-диаминопимелиновую кислоту. Доминирующие жирные кислоты клеточной стенки C_{14:0} и C_{16:1c9}.

Типовой штамм 14D1^T (=VKM B-2271^T = DSM 16153^T) выделен из криопэга в вечной мерзлоте, Колымская низменность, Северо-Восточная Арктика, Россия. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 31.4 мол. %.

***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°C, верхний предел роста 20°C. pH 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 D-глюкозу, ксилозу, инозит, сорбит, D-галактозу, мальтозу, арабинозу, маннозу, сахарозу, рибозу, маннит, D-фруктозу, рафиннозу, мелибиозу, трегалозу, крахмал, ксилан, целлобиозу, пептон, дрожжевой экстракт, фумарат, L-малат, лактозу, триптиказу, бетаин, холин. При сбраживании сахаров образует бутират, лактат, H₂ и CO₂. Пептидогликан содержит мезо-диаминопимелиновую кислоту. Доминирующие жирные кислоты клеточной стенки C_{14:0} и C_{16:1c9}.

Типовой штамм 14F^T (=VKM B-2368^T = DSM 17811^T) выделен из криопэга в вечной мерзлоте, Колымская низменность, Северо-Восточная Арктика, Россия. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 32.0 мол. %.

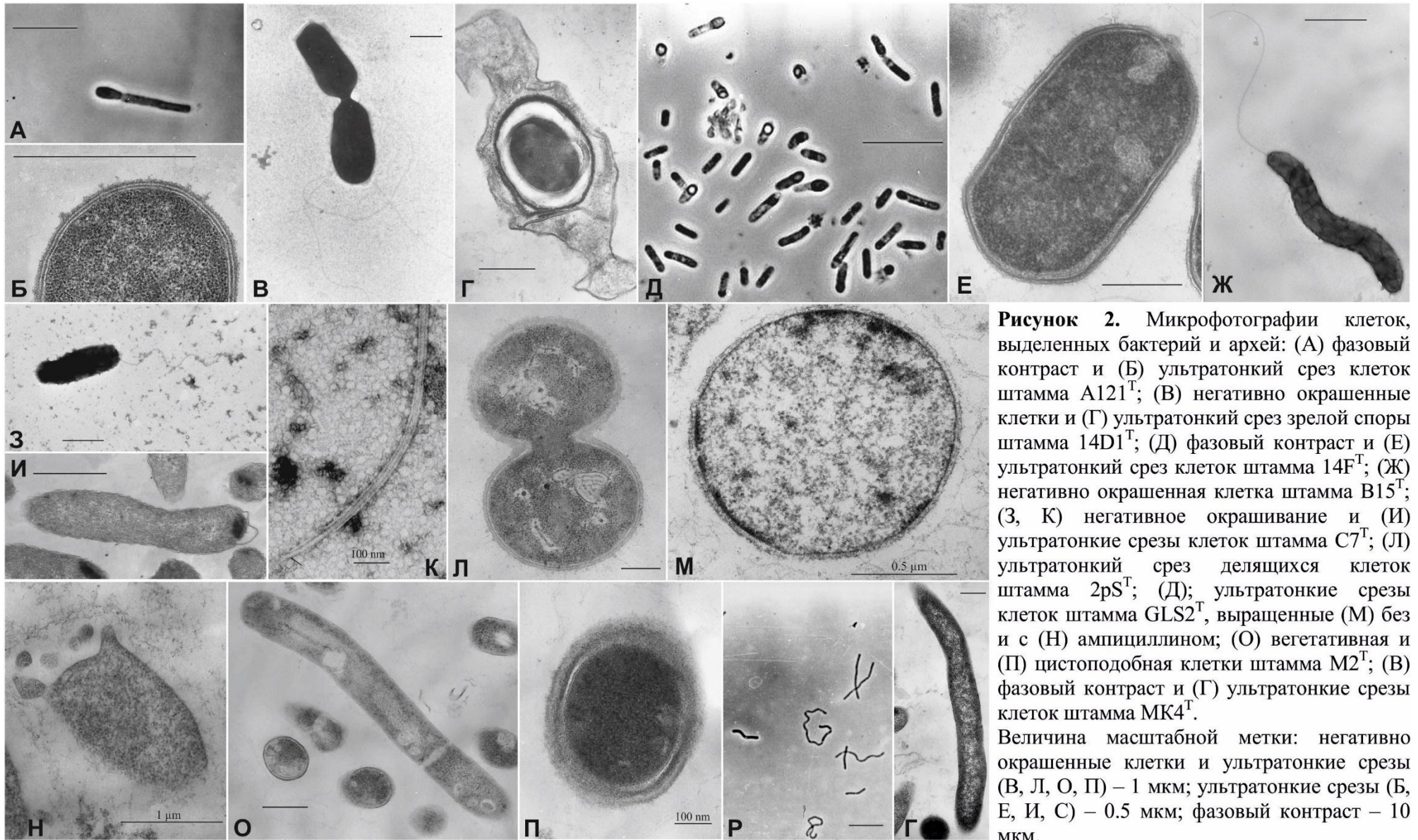


Рисунок 2. Микрофотографии клеток, выделенных бактерий и архей: (А) фазовый контраст и (Б) ультратонкий срез клеток штамма A121^T; (В) негативно окрашенные клетки и (Г) ультратонкий срез зрелой споры штамма 14D1^T; (Д) фазовый контраст и (Е) ультратонкий срез клеток штамма 14F^T; (Ж) негативно окрашенная клетка штамма B15^T; (З, К) негативное окрашивание и (И) ультратонкие срезы клеток штамма C7^T; (Л) ультратонкий срез делящихся клеток штамма 2pS^T; (Д); ультратонкие срезы клеток штамма GLS2^T, выращенные (М) без и с (Н) ампициллином; (О) вегетивная и (П) цистоподобная клетки штамма M2^T; (В) фазовый контраст и (Г) ультратонкие срезы клеток штамма MK4^T. Величина масштабной метки: негативно окрашенные клетки и ультратонкие срезы (В, Л, О, П) – 1 мкм; ультратонкие срезы (Б, Е, И, С) – 0.5 мкм; фазовый контраст – 10 мкм.

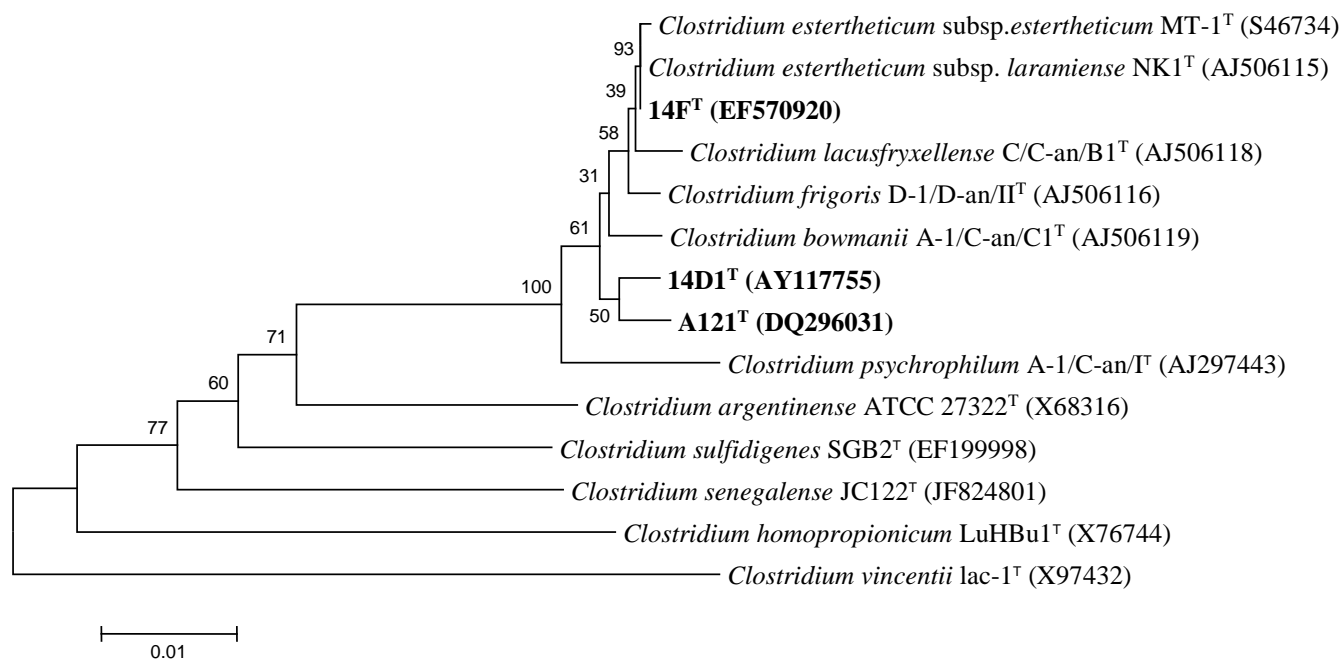


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, показывающая положение новых психрофильных клостридий, выделенных в работе. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках.

3.2 Сульфатредуцирующие бактерии

Арктические криопэги Колымской низменности характеризовались содержанием сульфатов до 3.84 г/л (табл. 2), 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.

Накопительная культура штамма В15 была получена путем инокуляции среды для СВБ водой из образца криопэга, вскрытого скважиной 21, и последующей инкубацией при температуре 15°C. Методом посева в тонкий слой пристенного агара с последующим пересевом образующихся колоний в жидкую среду удалось выделить чистую культуру штамма В15^T, клетки которого были подвижными вибрионами (Рис. 2, Ж). Накопительная культура К3S была получена путем стерильного переноса образца криопэга 3У на минеральную среду (рН 7.0-7.2) с лактатом и сульфатом и их последующей инкубацией при температуре 6 и 15°C в течение 8 месяцев. Для получения колоний инокулят из максимального разведения переносили на агаризованную среду и инкубировали в течение 4-5 недель. В результате пересева отдельных колоний с твердой среды в жидкую, из накопительной культуры криопэга 3У был выделен штамм К3S^T. Микроскопирование фиксированных клеток показало, что выделенный штамм представлен подвижными одиночными вибрионами, типичными для рода *Desulfovibrio*, размером 0.5×2.0 мкм. Движение осуществлялось с помощью двух монополярных очехленных жгутиков.

Мы определили фрагменты нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК штамма В15^T (1425 п.о.) и штамма К3S^T (1402 п.о.). Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что штаммы кластеризуются с бактериями рода *Desulfovibrio*. На филогенетическом древе (рис. 4) штамм В15^T объединяется в единый кластер с типовым штаммом вида *D. idahonensis* CY1^T (сходство 98.5 %), а ближайшим соседом штамма К3S^T с 97.4% сходства является *D. ferrireducens*, выделенный из донных отложений Арктического шельфа в районе о. Шпицберген (Vandieken et al., 2006).

В присутствии сульфата в качестве акцептора электронов штамм В15^T окислял водород (время удвоения 8.6 ч), формиат (20.0 ч), лактат (9.4 ч), пируват (12.0 ч) и этанол (17.0 ч). Для штамма было характерно неполное окисление лактата: в среде культивирования обнаруживался ацетат. Список акцепторов электронов, используемых при росте на лактате, дан в описании вида. При росте на лактате в присутствии сульфата рост штамма В15^T стимулировало добавление дрожжевого экстракта в концентрации 0.1 и 0.5 г/л. При этом время удвоения сокращалось с 9.4 ч при росте на минеральной среде без добавок до 6.7 и 5.6 ч, соответственно.

Сравнение фенотипических свойств и уровень ДНК-ДНК гибридизации штамма В15^T и типового штамма близкородственного вида *D. idahonensis* позволяет утверждать, что выделенная нами бактерия представляет новый вид рода *Desulfovibrio*, для которого мы предложили название *Desulfovibrio arcticus* (Pecheritsyna et al., 2012).

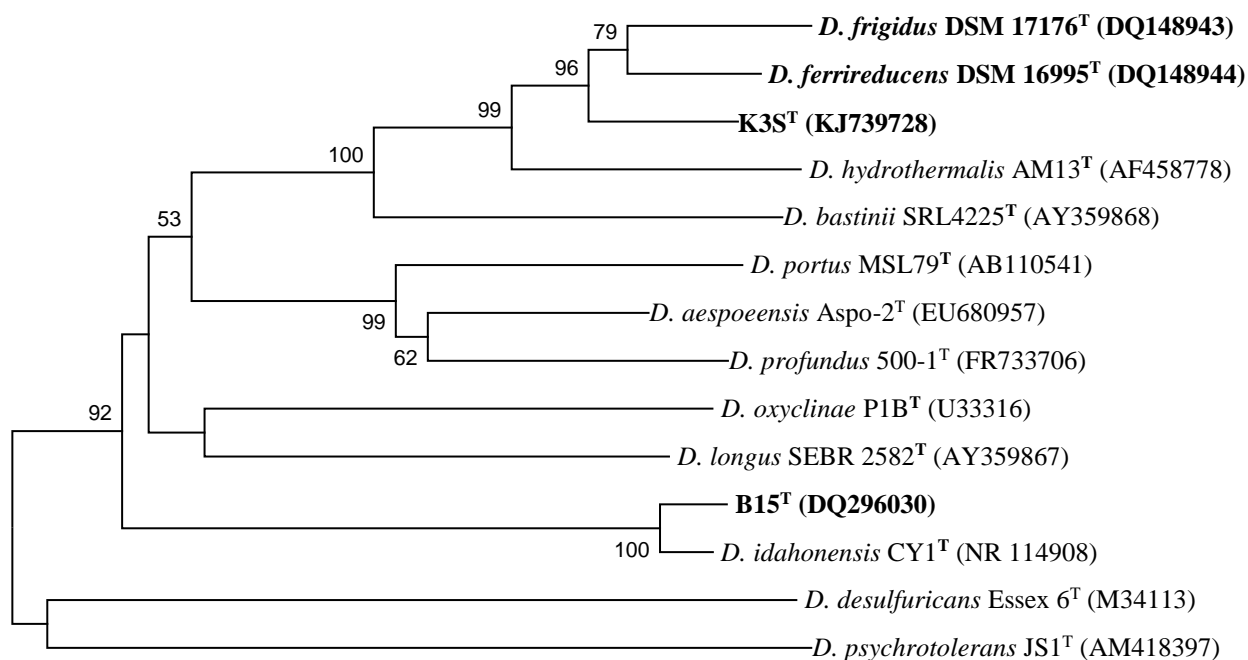


Рис. 4. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штаммов В15^T и К3S^T среди представителей рода *Desulfovibrio*. СВБ, выделенные из арктических экосистем, показаны жирным шрифтом. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов. Учетный номер базы данных GenBank указан в скобках.

Штамм K3S^T использовал лактат, формиат, пируват, фумарат, L-аланин, этанол и молекулярный водород в качестве доноров электронов в присутствии сульфата, причем наибольшее образование сульфида (7.9 мМ) наблюдалось при росте на аланине.

Помимо сульфата как конечного акцептора электронов штамм K3S^T восстанавливал сульфит, тиосульфат и элементную серу с образованием сульфида.

Уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК штамма K3S^T и типового штамма вида *D. ferrireducens* составил 97.4% сходства. В табл. 8 представлена общая характеристика генома нового сульфатредуктора, а результаты сравнения полногеномных последовательностей штаммов K3S^T *D. ferrireducens* DSM 16995^T (ANI 82.1%) свидетельствует о том, что выделенная бактерия, безусловно, является представителем нового 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, DL-лактат, пируват, этанол в присутствии сульфата. Не сбраживает DL-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 2.0%. Оптимум pH 6.7-7.0, диапазон pH 5.9-8.1. Доминирующие жирные кислоты клеточной стенки C_{15:0}, C_{16:0} и C_{16:1}ω7c.

Типовой штамм B15^T (=VKM B-2367^T = DSM 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 неспорные одиночные вибрионы размером 0.5×2.0 мкм, подвижные за счет двух монополярных очехленных жгутиков. Строгий анаэроб. Каталазо-отрицательная бактерия. Использует DL-лактат, формиат, водород, этанол, фумарат, L-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 DL-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 0.5 до 4.0 % (оптимум 2.0 %). Облигатно зависит от ионов Na⁺. Доминирующие жирные кислоты клеточной стенки C_{16:0} и C_{16:1}ω7c.

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 %.

3.3 Диназотрофная бактерия из Ямальского криопэга

Из криопэга (минерализация 77.2 г/л) в мерзлых толщах полуострова Ямал была выделена и охарактеризована диназотрофная 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 С7^T. Чистую культуру выращивали и поддерживали при 18°C в среде, содержащей 80 г/л NaCl и 5.0 г/л MgSO₄·7H₂O и pH 6.0-6.2.

Клетки штамма С7^T были подвижными палочками с закругленными концами с одним полярным жгутиком (рис.2, 3). Особенностью ультраструктуры жгутика было наличие по всей длине оболочки, вероятно белковой природы, что было выявлено с помощью электронной микроскопии негативно окрашенных препаратов целых клеток (рис.2, И). Окрашивание стандартными методами не давало точных результатов, но электронная микроскопия тонких срезов клеток штамма выявила структуру граммотрицательной клеточной стенки с типичной наружной мембраной (Рис.2, К).

Сравнение близких к полноразмерным последовательностям генов 16S рНК и штамма С7^T (1400 п.о.) с последовательностями в базе данных NCBI показало, что штамм относится к классу *Gamma*proteobacteria, к семейству *Celerinatantimonadaceae* порядка *Alteromonadales*. Филогенетический анализ, показал, что С7^T и *C. diazotrophica* представляют собой монофилетическую ветвь, отличную от других семейств порядка *Alteromonadales*. Наибольшее сходство последовательностей гена 16S рНК нового штамма было с типовым штаммом валидно описанного вида *Celerinatantimonas diazotrophica* и составляло 95.5%. Для штамма С7^T была также определена частичная последовательность *nifH* гена 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 диназотрофов этого класса.

Учитывая различия хемотаксономических, генотипических и фенотипических свойств штамма С7^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).

***Celerinatantimonas yamalensis* sp.nov.** (ya.mal.en'sis. N.L. fem. adj. yamalensis, ямальский, 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°C с оптимумом при 18-22°C. Рост наблюдается при концентрациях NaCl от 20 до 120 г/л с оптимальной концентрацией NaCl 20-80 г/л; при значениях pH от 5.5 до 7.5 (оптимальный - 6.0-6.2). Бактерии не способны восстанавливать нитрат или продуцировать H₂S 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%). Кислоту образует из D-глюкозы, целлобиозы,

раффинозы, арабинозы и D-фруктозы, но не из мальтозы или лактозы. Положительная реакция наблюдалась в следующих ферментативных тестах АРҮ ЗҮМ: щелочная и кислая фосфатазы, лейцин-ариламидаза, эстераза (С₄), липаза эстераза (С₈), нафтол-AS-VI-фосфогидролаза. Штамм чувствителен к тетрациклину и устойчив ко многим антибиотикам, которые перечислены в описании вида.

В качестве единственного источника углерода использует D-глюкозу, раффинозу, арабинозу, D-фруктозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, целлобиозу, ксилан, дульцит, сорбит, глицерин, сукцинат, фумарат, L-малат, пируват, цитрат, D-глюконат, N-ацетилглюкозамин. Основной хинон дыхательной цепи убихинон Q-8. Преобладающими жирными кислотами являются С_{16:0}, С_{16:1}ω7, С_{18:1}ω7 и С₁₇сус.

Типовой штамм С7^T (= VKM В-2511^T = DSM 21888^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%.

3.4 Факультативно-аэробные бактерии *Psychrobacter* spp.

Из образцов воды криопэга, вскрытого скважиной 14/99 на Колымской низменности, при посеве на агаризованную среду R2A были выделены три аэробных штамма 1pS, 2pS и 3ps. Дальнейшие исследования выделенных бактерий показали, что первые два представляют собой новый вид *Psychrobacter muriicola* с типовым видом 2 pS^T (Рис. 2, Л), а штамм 3ps = VKM В-2360 относится к известному виду *P.maritimus*. (Romanenko et al., 2004).

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

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. Хемоорганотроф. Реакция на оксидазу и каталазу положительна. Оптимальный рост наблюдался при температуре 18-20°C, максимальная температура роста 37°C, минимальная – -2°C. Диапазон рН от 5.8 до 8.5 (оптимум 6.5-7.5), солёности от 0 до 100 г/л, оптимум при 3-8 г/л NaCl. Способен к росту в анаэробных условиях на ацетате. Не образует кислоту из углеводов. Положительный результат дали тесты на фенилаланиндезаминазу, нитратредуктазу и уреазу. Отрицательные результаты дали тесты на аргининдезаминазу, лизиндекарбоксидазу, орнитиндекарбоксилазу, гидролиз крахмала, образование индола и H₂S. Положительный результат дали тесты на щелочную и кислую фосфатазу, лейцинариламидазу, эстеразу (С₄), эстеразу липазу (С₈), нафтол-AS-VI-фосфогидролазу. В качестве единственного источника углерода и энергии использует дрожжевой экстракт, пируват, глутарат, фумарат, капроат, гептаноат, бутират, L-малат, DL-лактат, цитрат, L-пролин, L-тирозин, метанол, бутанол, дульцит. Факторы роста не требовались. Основная жирная кислота клеточной стенки при оптимальной температуре роста С_{18:1}.

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

Исследование особенностей штаммов *Psychrobacter* spp., выделенных из криопэгов показало, что клеточные полисахариды изолятов включают ранее неизвестные природные соединения (Kondakova et al., 2012; 2012a; 2012б). Мы также

определили липазную активность в клетках штаммов анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, выделенных из постоянно холодных мест обитания. Наибольшие значения (167.7 ед/мл) были получены для факультативно-анаэробной бактерии *P. glacicola*, 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.

3.5 Описание бактерии-спутника *Methanosarcina* sp.

Штамм GLS2^T был выделен нами из метаногенной бинарной культуры, и характеризовался устойчивостью к широкому спектру антибиотиков, используемых при выделении метанобразующих архей. Методом клонирования и последующего секвенирования генов 16S рРНК бактериальный спутник был идентифицирован как представитель рода *Sphaerochaeta*, что позволило подобрать необходимые условия для получения его чистой культуры. Микроскопические исследования показали, что клетки новой бактерии были неподвижными, имели сферическую или овальную форму, часто объединяясь в агрегаты различных размеров, напоминающие шары. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии удалось определить грамтрицательный тип клеточной стенки. Штамм GLS2^T, как и другие виды этого рода, рос в присутствии ампициллина. Бактерии рода *Sphaerochaeta* синтезируют нежесткую дефектную клеточную стенку, которая определяет сферическую изменчивую морфологию (рис. 2, М). Электронная микроскопия клеток GLS2^T, выращенных с ампициллином в обычной основной солевой среде, показала многочисленные формы без явной клеточной стенки. Некоторые из этих клеток имели очень небольшие размеры (около 100 нм) и, по-видимому, образовывались путем экстрюзии мембраны (рис. 2, Н) с последующим образованием везикул, часть из которых содержала ДНК.

Сравнение последовательности гена 16S рРНК штамма GLS2^T с последовательностями, депонированными в ГенБанке показало, что новая бактерия образует единый кластер с представителями рода *Sphaerochaeta* и имеет наибольшее сходство (99.3%) с *S. globosa* Buddy^T. На основании сравнения морфологических, физиологических, филогенетических свойств и сравнения полногеномных последовательностей штамма GLS2^T и типовых штаммов других видов рода нами был предложен новый вид *Sphaerochaeta associata* (Troshina et al., 2015).

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

Клетки грамтрицательные 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. 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.

Преобладающими жирными кислотами являются C_{16:0}, C_{16:1}ω7, C_{18:1}ω7 и C₁₇сус.

Типовой штамм GLS2^T (= VKM B-2742^T = DSM 26261^T) был выделен из бинарной культуры с *M. mazei* JL01. Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 47.2±0.8 мол.% (50.6% по геному). Последовательность гена 16S рРНК депонирована в GenBank под учетным номером JN944166.

3.5.1 Влияние *S. associata* GLS2^T на 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 мерзлых отложений, так и метаногенов, выделенных из наземных источников. Полученные результаты показали, что совместное культивирование штамма JL01^T и сахаролитической бактерии *S. associata* штамм GLS2^T на среде для метаногенных архей (метанол в качестве субстрата) приводило к сокращению лаг-периода и к увеличению продукции метана на 25 %.

Подобное влияние *S. associata* на рост других метаногенов, как выделенных из мерзлоты (*M. arcticum* M2^T, *M. veterum* MK4^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, или супернатант культуры, не оказывали стимулирующего воздействия ни на один из исследованных штаммов метаногенов.

3.5.2 Геномика бактерий рода *Sphaerochaeta*

В попытке разобраться в причинах стимулирующего воздействия бактерии – спутника на рост метаносарцины мы получили данные геномного секвенирования штамма GLS2^T (табл. 8) и сравнили их с геномами других сферохет, выделенных к настоящему моменту – *S. globosa*, *S. coccoides* и *S. pleomorpha*. компонента каркаса метаносарцин.

Таблица 8. 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, полученные в результате горизонтального переноса	344	392	11	123

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. У штамма GLS2^T присутствуют гены, кодирующие белки метаболизма хондроитина, аналога метанохондроитина. 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.

Сравнение функциональных профилей геномов *Sphaerochaeta* и некоторых других микроорганизмов (рис. 5) 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 уроновых кислот. Все это согласуется с характеристикой сферохет как анаэробных хемогетеротрофов-сахаролитиков.

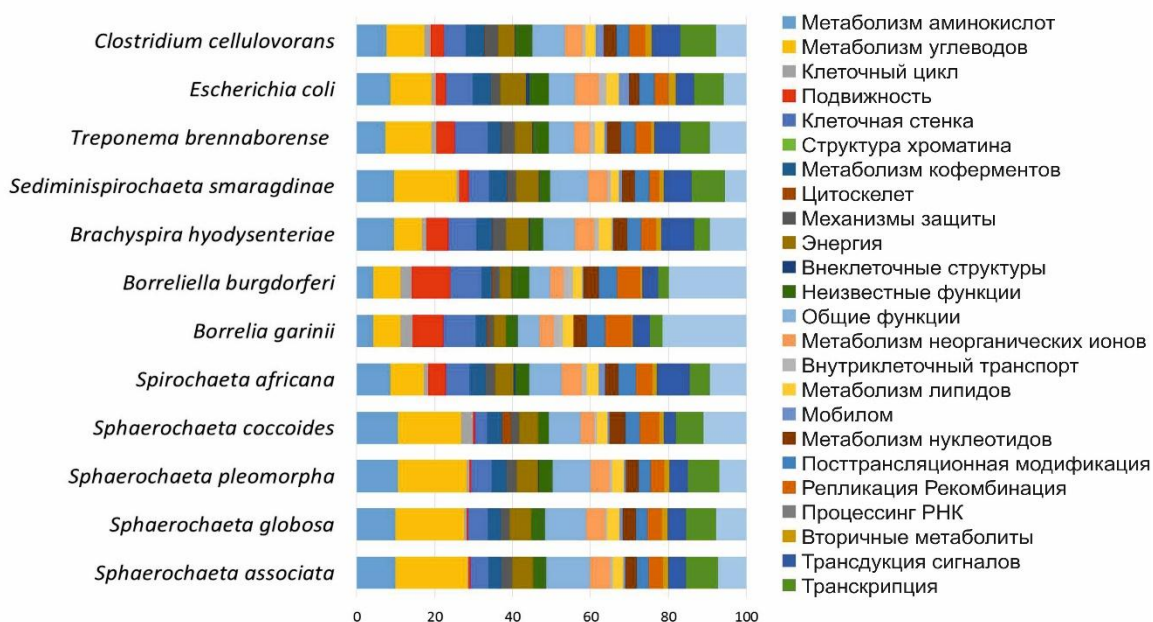


Рис. 5. Функциональная характеристика генома *S. associata* и некоторых других микробных геномов на основе базы данных COG.

Наличие генов деградации хондроитина, являющегося аналогом метанохондроитина метаносарцин, а также возможность получать предшественники для синтеза кобаламина от архей создают, по-видимому, основу для тесного сосуществования *S. associata* с со штаммом метаногена. Доля генов, полученных в результате горизонтального переноса, в геноме *S. associata* GLS2^T весьма значительна: их общее число составляет 344 гена (табл. 8), 73% которых получено от представителей *Firmicutes* и только 2 гена от *Archaea*.

3.6 Метанобразующие археи

Накопительные метаногенные культуры получали путем культивирования мерзлых арктических образцов при температурах от 5 до 28°C. Максимальное

образование метана наблюдалось в культурах, инкубированных при 15-17°C в течение 12-18 месяцев. На рис. 6 представлен пример динамики образования метана в накопительной культуре с голоценовым образцом вечной мерзлоты. В дальнейшем было выделено три штамма метаногенов: водородиспользующий штамм M2, ацетатиспользующий штамм JL01 из мерзлых голоценовых грунтов возрастом около 5 тысяч лет и водородиспользующий штамм МК4 – из плиоценовых мерзлых грунтов возрастом около 3 млн лет.

Водородиспользующие метаногены. Клетки штамма M2^T были неподвижными слегка изогнутыми палочками, часто образующими нити длиной более 30 мкм (рис. 2, О). В стационарной фазе роста или при длительном хранении в культуре клеток обнаруживались цистоподобные коккоидные клетки (Рис. 2, П.), не наблюдавшиеся ранее у водородпотребляющих палочковидных метаногенов. Клетки штамма МК4^T представляли собой палочки с заостренными концами (Рис.2, Р, С). Клетки делились путем образования перегородки, и окрашивались по Граму отрицательно.

Из ДНК изолятов были секвенированы большие фрагменты генов 16S рРНК 1434 п.о. (M2^T) и 1347 п.о. (МК4^T). Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что оба штамма относятся к семейству

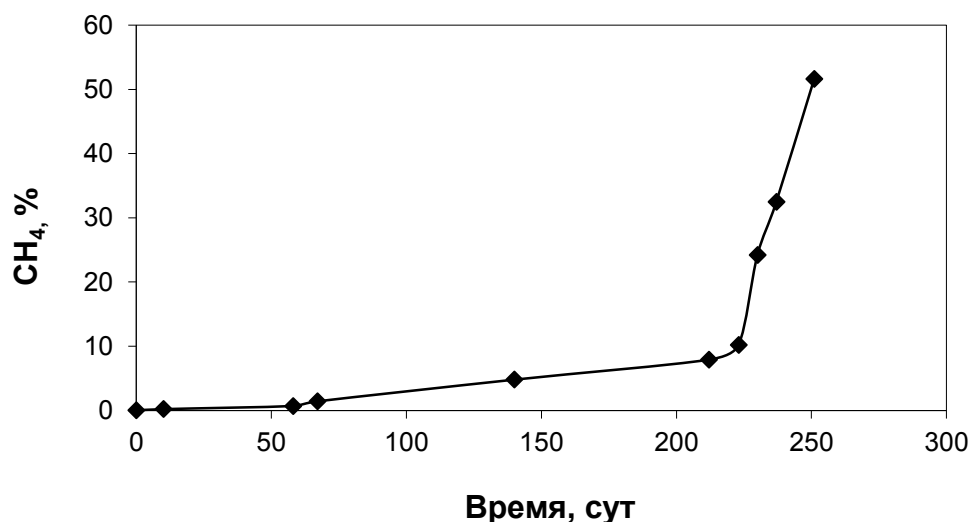


Рис. 6. Образование метана из H₂ и CO₂ в накопительной культуре из голоценовых (5000 лет) мерзлых пород при температуре 15°C.

Methanobacteriaceae из порядка *Methanobacteriales*, где ближайшим их родственником является *Methanobacterium bryantii* М.о.Н.^T со сходством 99.3 и 99.4%, соответственно. Однако, новые метаногены отличались между собой и от близкородственного вида по некоторым фенотипическим характеристикам, в том числе по спектру субстратов для метаногенеза. Нами были секвенированы геномные последовательности штаммов M2^T и МК4^T. Их сравнение показало, что геномы близки по размерам 3.37 и 3.39 млн п.о. (табл. 8), соответственно, а группы генов, отвечающих за осуществление метаногенеза, отличаются только количеством копий генов 5,10-метилентетрагидрометанооптерин редуктазы (1.5.99.11). Возможно, возраст вечной мерзлоты, из которой выделены эти метаногены, объясняет различие в количестве генов, полученных в результате горизонтального переноса (табл. 8).

Определение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* показало, что сходство между *M. bryantii* M.o.H.^T, *M. veterum* МК4^T и *M. arcticum* М2^T находится в пределах от 26.6 до 48.5%. Это подтверждает их принадлежность к разным видам рода *Methanobacterium*, как и различие по ANI, находящееся в пределах от 77.5 до 92.3 %.

Принимая во внимание фенотипические различия, низкие значения гибридизации ДНК-ДНК с ближайшими родственниками в том числе, определенные *in silico*, а так же значения сравнения полных геномов, мы предложили, выделить штаммы М2^T и МК4^T в новые виды рода *Methanobacterium*, *Methanobacterium arcticum* (Shcherbakova et al., 2011) и *Methanobacterium veterum* (Krivushin et al., 2010).

***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. Рост не наблюдается при pH 5.5 или 9.0. Использует H₂+CO₂ и формиат для роста и образования метана. Рост не стимулируется ацетатом и другими органическими добавками.

Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма М2^T (=VKM В-2371^T = DSM 19844^T), выделенного из голоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, Россия (70°06' с.ш., 154° 04' в.д.) составляет 38.1 мол.% (33.2% по геному).

***Methanobacterium veterum* sp.nov.** (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. Добавление ацетата стимулирует рост. Оптимальные условия роста: 28 °С, pH 7.0–7.2 и 0.05 М NaCl.

Содержание Г+Ц в ДНК типового штамма МК4^T (=VKM В-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.% (33.2% по геному).

Ацетатиспользующий штамм JL01. Методом длительного культивирования в анаэробных условиях при 15°C с использованием ацетата в качестве источника углерода в присутствии пенициллина была получена бинарная метаногенная культура, состоящая из использующего ацетат метаногена и бактерии *S.associata* GLS2^T. Путем многократных пересевов с антибиотиками различных классов нам удалось получить чистую культуру археи, обозначенную нами как штамм JL01, и охарактеризовать ее.

Клетки штамма JL01 были неподвижны, окрашивались по Граму положительно и представляли собой нерегулярные кокки, располагающиеся в виде агрегатов.

Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК показал, что штамм JL01^T 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).

Штамм JL01 был мезофилом, рос при температуре от 10 до 37°C (оптимальный рост при 24-28°C), тогда как референтный штамм *M. mazei* S-6^T - от 20 до 50°C (оптимальный рост при 37°C) и нейтрофилом, растущим в диапазоне pH 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.

Сравнение фенотипических характеристик штамма JL01 с типовыми штаммами близкородственных видов показало, что все они имеют сходные оптимальные параметры роста. Однако штамм JL01 отличался окрашиванием клеток по Граму, более низким значением нижней границы температурного диапазона роста и неспособностью к автотрофному росту на H₂ и CO₂. Содержание Г + Ц пар в ДНК штамма JL01 и штамма S-6^T составило 39.2 и 42.3 мол.%, соответственно. Однако сравнение полных 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.

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 обладала 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).

Нами получены геномные последовательности всех выделенных метаногенов, *S. associata* GLS2^T, а также СББ '*D.gilichinskyi*' K3S^T 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.

Таблица 9. Психрофильные и психроактивные анаэробные и факультативно-анаэробные прокариоты, выделенные из мерзлых отложений и криопэггов.

Организм	Температурный диапазон	Субстраты/продукты	Местообитание
----------	------------------------	--------------------	---------------

		(оптимум), °C		
<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	

Как следует из выше изложенного, разнообразие культивируемых анаэробных и факультативно-анаэробных прокариот мерзлых пород и криопэгов представлено бактериями и археями, которые по предложению Р. Кавичолли (Cavichioli, 2016) можно отнести к психрофильным в виду того, что все они выделены из мест обитания, характеризующихся постоянными отрицательными температурами. 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. 9) 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 арктических 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.

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

4. Адаптация бактерий и архей к условиям обитания

4.1 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. algoriphilum* 14D1^T, '*C. frigoriphilum*' 14F^T, *D. arcticus* B15^T, '*D. gilichinskyi*' K3S^T, *Psychrobacter* spp. 1pS, 2pS^T, 3ps со временем удвоения от 2 до 18 дней.

Для *C. algoriphilum* и '*C. frigoriphilum*' был рассчитан экономический коэффициент, который существенно не изменялся при оптимальной и отрицательных температурах культивирования, а у *C. algoriphilum* даже возрастал при -2°C, что согласуется с литературными данными (Knoblauch and Jorgensen, 1999; Tarpgaard 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. 9).

Результаты исследований одновременного влияния температуры и солености на скорость роста *C. algoriphilum* и '*P. muriicola*' (Рис.7) показали, что для роста изолятов при отрицательной температуре было характерно увеличение галотолерантности. Так, при 5°C рост *C. algoriphilum* при 4,5% NaCl в среде прекращался, а при -5°C продолжался даже при 10% NaCl. '*P. muriicola*' 2pS^T при -2°C рос даже при солености 10%. Кроме того, у *C. algoriphilum* происходил сдвиг оптимума солености с 0.5 до 1.0 % (рис. 7, а).

Таблица 10. Параметры роста психрофильных изолятов при периодическом культивировании.

Показатель	<i>C. algoriphilum</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

Проверка способности новых изолятов утилизировать органические соединения при различных температурах 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 (5 и -2°C).

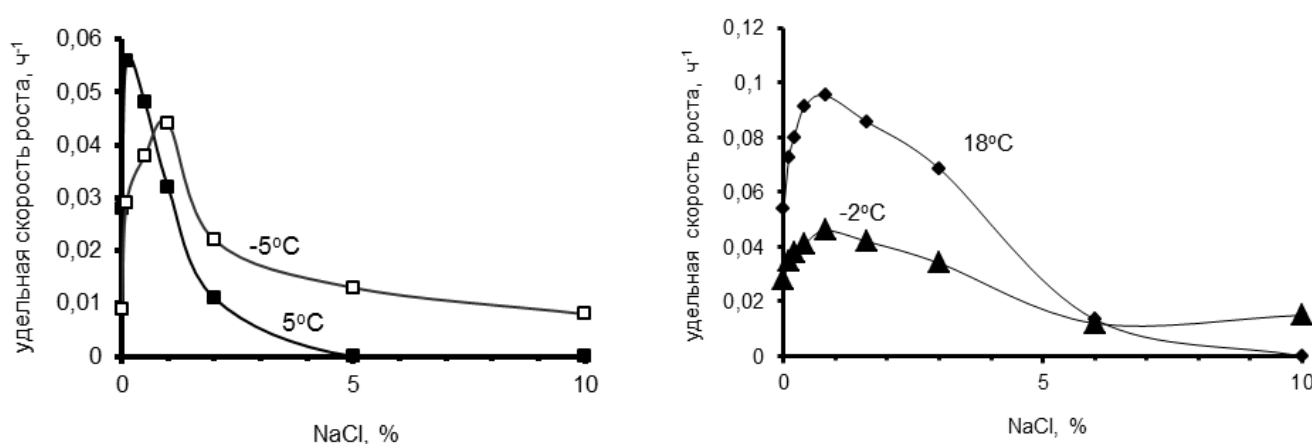


Рис. 7. Влияние температуры культивирования и солености среды на удельную скорость роста *S. algoriphilum* 14D1^T (а) и *P. muriicola* 2pS^T (б).

4.2 Состав жирных кислот клеток изолятов

Для жирнокислотного состава клеток, выделенных бактерий, было характерно высокое содержание ненасыщенных соединений. За исключением *S. associata*, более половины соединений имели одну или две ненасыщенные связи (Рис. 8).

Для жирнокислотного состава клеток *S. algoriphilum* было характерно преобладание тетрадекановой и омега7-цис-гексадеценной кислот. Содержание непредельных соединений в клетках при оптимальной температуре составляло 57.0 %, а при снижении температуры культивирования (-2°C) клетки содержали 68.8 % ненасыщенных соединений. При этом уменьшалось процентное содержание тетрадекановой, пентадекановой, гексадекановой и октадекановой кислот и значительно увеличивалось содержание омега7-цис-гексадеценной кислоты.

Жирнокислотный состав клеток *P. muriicola* 2pS^T характеризовался высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, сумма которых при оптимальной температуре и солености составляла 79.8%. Культивирование при температуре, ниже оптимальной (-2°C) или выше (28°C) не приводило к значительным сдвигам в соотношении сумм насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Культивирование

при повышенной солености приводило к небольшому увеличению доли ненасыщенных жирных кислот при оптимальной и отрицательной температурах. Интересным результатом эксперимента оказалось появление некоторых соединений, не характерных для бактерий рода *Psychrobacter*, при -2°C и повышенной солености (50 г/л): кислот $\text{C}_{15:1}\omega 6$, $\text{C}_{17:0}$ 10 Me, $\text{C}_{18:0}$ 10 Me, $\text{C}_{20:1}\omega 9t$ и альдегида $\text{C}_{11:0}$.

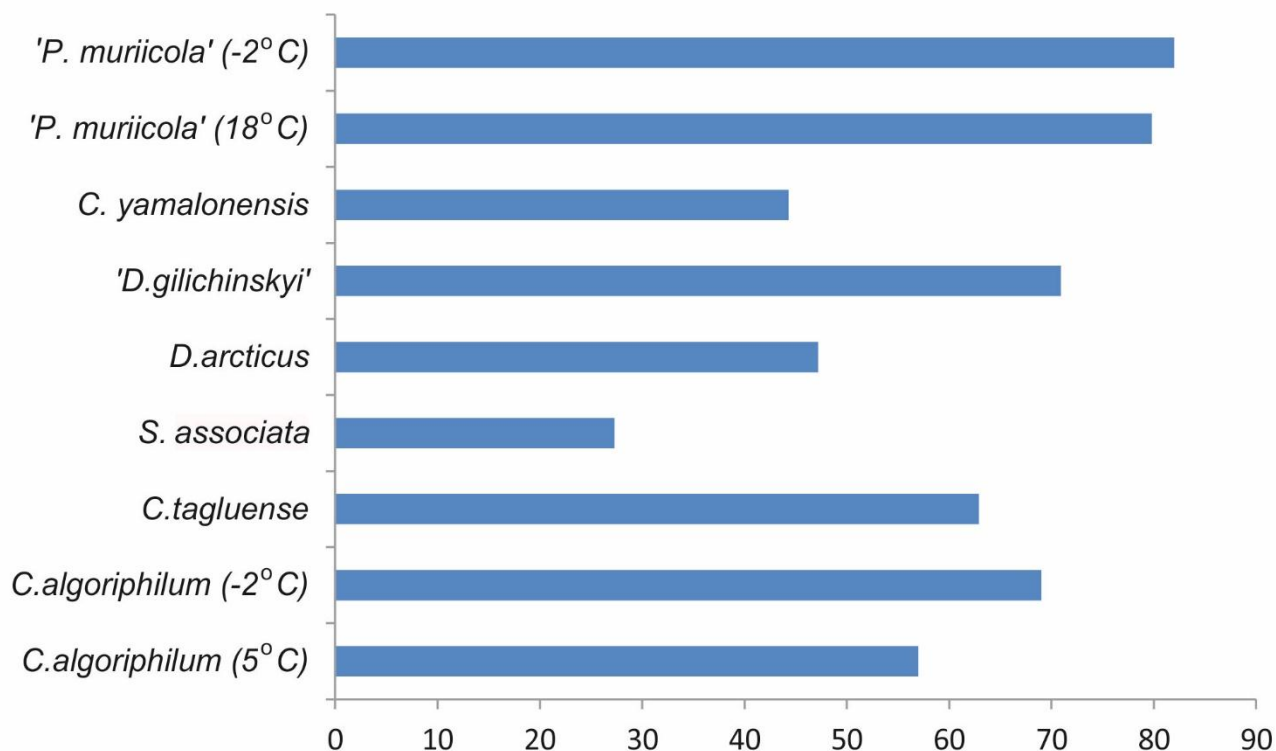


Рис. 8. Содержание ненасыщенных жирных кислот (%) в клетках выделенных бактерий.

Обнаруженные нами 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, 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.

Адаптация мембраны к низкой температуре являлась предметом изучения многих исследователей. *C. algoriphilum* использует стратегию увеличения доли ненасыщенных жирных кислот для роста при отрицательной температуре, хотя уже при оптимальной их уровень достаточно высок (57%). Несмотря на то, что сдвиг в температуре культивирования '*P. muriicola*' 2pS был очень значительным (28, и -2°C), сумма ненасыщенных жирных кислот мембран этого штамма почти не менялась. Однако, в спектре жирных кислот появлялись метилированные соединения и изменялось соотношение цис- и транс-изомеров гексадеценовой кислоты.

4.3 Внутриклеточный полисахарид *C. algoriphilum*

Одним из важных способов выживания микроорганизмов является образование внутриклеточных полимерных веществ (полисахаридов, липидов, полифосфатов), которые могут быть источниками углерода и (или) энергии в стрессовых условиях.

При исследовании ультратонких срезов клеток *C. algorithum* 14D1^T, выращенных при оптимальной и отрицательной температурах, обнаружился различный характер заполнения цитоплазмы. Цитоплазма клеток, выращенных при оптимальной температуре, была заполнена электронпрозрачным веществом. Клетки, выращенные при -5°C, имели совершенно другой характер заполнения цитоплазмы: электронпрозрачного вещества было значительно меньше. Мы предположили, что, возможно, накопление данного вещества является температурозависимым процессом.

Гомогенаты клеток окрашивались раствором Люголя в темно-коричневый цвет, что свидетельствовало о полисахаридной природе содержащегося в цитоплазме вещества. 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%. 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.

Таким образом, в клетках *C. algorithum* 14D1 накапливается гликогенподобное соединение, состоящее из остатков D-глюкозы, соединенных преимущественно α -1-4 связями. Исследование динамики накопления полисахарида клетками *C. algorithum* в процессе роста культуры показало, что отношение полисахарид/сухой вес оставалось относительно постоянным на протяжении роста культуры и составляло 25-28% при начальной концентрации глюкозы 2 г/л (рис.9).

Количество полисахарида в клетках зависело от начальной концентрации глюкозы в среде культивирования. По мере возрастания концентрации глюкозы содержание полисахарида в клетках возрастало. 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 сухого веса клетки. Рост в лимитирующих условиях (по азоту) сопровождался образованием 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.

Нам представляется очевидным, что внутриклеточный полисахарид *C. algorithum* играет роль резервного вещества. По Уилкинсону (Wilkinson, 1959), вещество выполняет функцию запасания 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. 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.

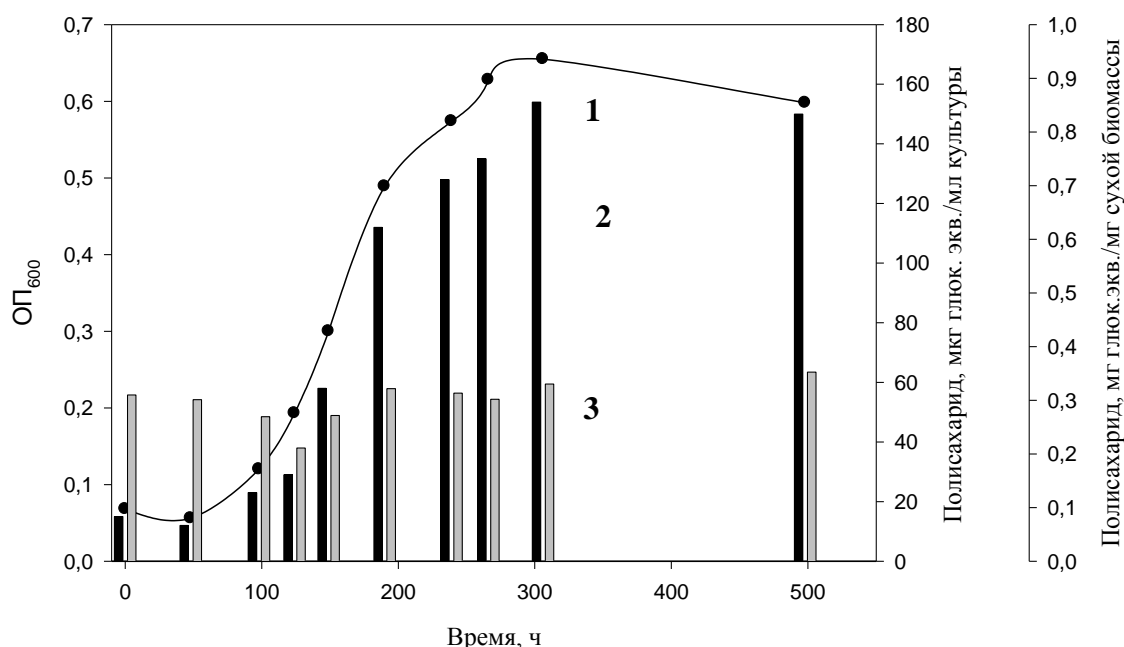


Рис. 9. Изменение содержания внутриклеточного полисахарида *Clostridium algoriphilum* в процессе роста при оптимальной температуре. 1 - оптическая плотность; 2 - содержание полисахарида в единице объема культуры, мг глюкозных эквивалентов/мл; 3 - относительное содержание полисахарида в клетке, мг глюкозных эквивалентов/ мг сухой биомассы.

Способность синтезировать резервные соединения является большим преимуществом в борьбе за существование. Внутриклеточное накопление полимерных соединений (полисахаридов) является типичным для клостридий. О накоплении, структуре и функции внутриклеточных полисахаридов психрофильных клостридий пока данные в литературе отсутствуют. Мы впервые показали, что психрофильные клостридии также образуют внутриклеточный полисахарид, накопление которого зависело от температуры культивирования и солености среды, типа и концентрации субстрата.

4.4 Образование антифризного белка *C.tagluense* A121^T

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). Впервые присутствие белка, приводящего к термальному гистерезису (ТН), в бактериях было продемонстрировано Думаном и Олсеном (Duman and Olsen, 1993), а штамм *Moraxella* sp. стал первым бактериальным продуцентом AFPs (Yamashita et al.,

2002). С тех пор антифризная активность была обнаружена в небольшом количестве бактерий, значительная часть которых представляет собой антарктические изоляты, что прямо указывает на роль AFPs в холодной адаптации бактерий.

Все культуры микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых отложений, были протестированы на наличие AFPs. Образование кристаллов при понижении температуры наблюдали в нативных образцах культуральной жидкости, а также в клетках, разрушенных ультразвуком. Как показали результаты, из 23 протестированных штаммов только разрушенные ультразвуком клетки бактерии *C. tagluense* A121^T содержали AFP.

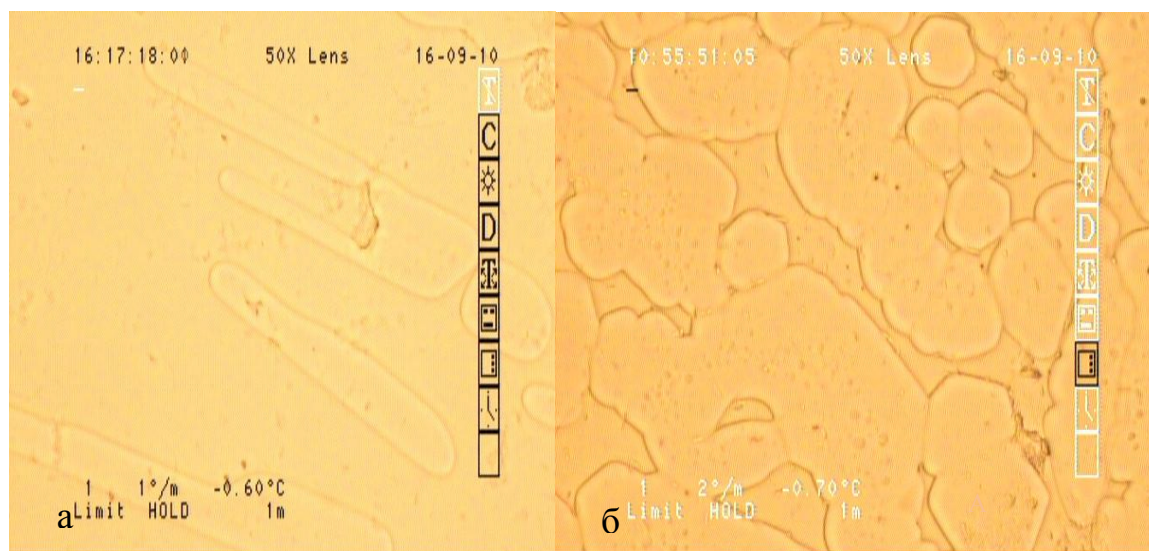


Рис. 10. Микрофотографии структур, образующихся при охлаждении *M. arcticum* M2^T (а) и *C. tagluense* A121^T (б). Наблюдения проводились при увеличении 40х в проходящем свете.

Антифризная активность у штамма A121^T индуцировалась пониженной температурой (4°C) и не обнаруживалась при оптимальной температуре культивирования (15-18°C). В 2016 году в Национальном Институте Полярных исследований (г. Саппоро, Япония) был секвенирован геном *C. tagluense* A121^T (MiSeqIllumina). Результаты анализа генома показали, что секретируемый антифризный белок кодируется уникальными генами, образующими отдельную ветвь среди генов, кодирующих AFPs других бактерий. Несмотря на то, что полученные данные требуют дополнительного анализа, они, безусловно, свидетельствуют о том, что микроорганизмы вечной мерзлоты является важным резервуаром новых AFPs, которые считаются перспективным биотехнологическим продуктом для применения в пищевой, косметической, топливной и других отраслях промышленности. Нами впервые показано наличие AFP в клетках анаэробной бактерии, и дальнейшие исследования позволят определить уникальность обнаруженных белков.

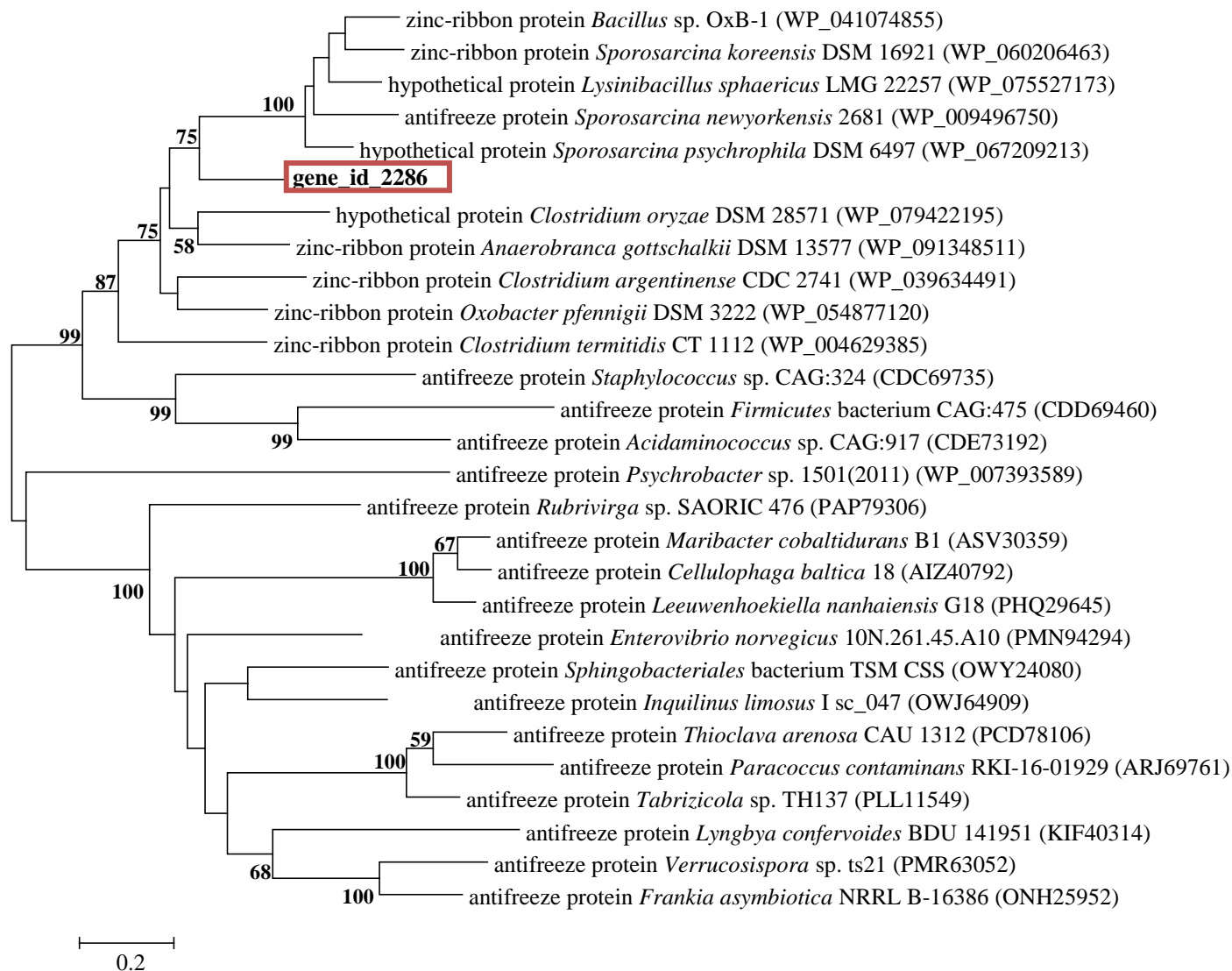


Рис. 11. Филогеномная дендрограмма, показывающая положение антифризного белка из *C. tagluense* A121^T (gene_id_2286) среди близкородственных белков.

5. Метаногены мерзлоты – модельные организмы для решения проблем астробиологии

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.

Интерес к метаногенам, как модельным объектам для решения проблем астробиологии возобновился с обнаружением в атмосфере Марса метана (Mumma *et al.*, 2003). Постоянное обнаружение метана в разреженной атмосфере этой планеты указывало на его постоянное пополнение (Hitchcock & Lovelace, 1967). Анаэробные хемолитотрофные психротолерантные метаногенные микроорганизмы с их способностью усваивать углекислый газ и другие неорганические соединения являются подходящими моделями для форм жизни, которые могут существовать в мерзлых

подповерхностных средах на Марсе, где недоступны органические соединения, нет свободного кислорода и крайне низкое количество незамерзшей воды. Другой аспект экзобиологии – изучение выживания микроорганизмов в условиях космического пространства – также можно исследовать на примере метанобразующих архей. Для подготовки к эксперименту по выживанию микроорганизмов на внешней стороне Международной космической станции (ФГБУН ИМБП РАН), нами было изучено влияние УФ-облучения и вакуумирования, как факторов космического пространства, на жизнеспособность метаногенов.

5.1 Исследование влияния перхлоратов

В 2008 года лабораторией Wet Chemistry (USA) был выполнен химический анализ марсианского грунта, в котором было обнаружено до 0.6% перхлоратов (ClO_4), которые являются сильными окислителями. Мы проверили ингибирующее действие перхлоратов натрия и магния на пять штаммов метаногенов (*M. veterum* МК4^T, *M. arcticum* М2^T, *M. mazei* JL01, *M. bryantii* М.о.Н.^T и *M. mazei* S-6^T).

Полученные результаты показали, что внесение в питательную среду от 2.1 до 9.0 мМ $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ приводило к снижению продукции метана у всех метаногенных штаммов на 20%. Следует отметить, что *M. arcticum* М2^T был наиболее устойчив к действию этих солей. Что касается *M. bryantii* М.о.Н.^T, добавление 9.0 мМ $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ и 9.8 мМ NaClO_4 снижало метанобразование данным штаммом на 80%. Совместное добавление перхлоратов натрия и магния во всех случаях усиливало ингибирующий эффект. Концентрации, при которых эти соли ингибировали рост клеток, соответствуют их активности как хаотропных стрессоров (Bhaganna *et al.*, 2010; Cray *et al.*, 2015), которые способны разупорядочивать клеточные макромолекулы.

Рост исследуемых архей на среде с добавлением 5 мМ перхлоратов характеризовался низкой продукцией биомассы и, как следствие, низким содержанием метана. Метаногены, выделенные из вечной мерзлоты, оказались более устойчивы: рост *M. bryantii* ингибировался в большей степени, чем рост *M. veterum* МК-4^T и *M. arcticum* М2^T (Shcherbakova *et al.*, 2015). Мы исследовали изменение содержания перхлоратов в среде культивирования через девять дней роста *Methanobacterium* spp. Изменение содержания NaClO_4 (5.7-16.1%) у *M. bryantii* М.о.Н.^T и $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (16.0-7.2%) у *M. veterum* МК4^T не превышало уменьшение концентрации перхлоратов в контроле (19.0 и 17.6%, соответственно). Однако в культуральной среде штамма *M. arcticum* М2^T содержание NaClO_4 снизилось на 31.8%, а $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ - на 45.6%. 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, открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии метаногенами, в том числе во внеземных условиях.

5.2 Влияние ультрафиолетового облучения и вакуумирования

Для этого эксперимента были отобраны штаммы метаногенов имеющие наибольшую вероятность выживания в неблагоприятных условиях: *M. arcticum* M2^T, *M. mazei* S-6^T, и *M. mazei* JL01.

Доза УФ-облучения в эксперименте соответствовала количеству ультрафиолета, которое получит культура архей, вращаясь с МКС вокруг Солнца в течение трех суток. Результаты воздействия УФ-облучения показали (рис. 12), что 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^T облучение в количестве 166.4 Дж/см² привело к увеличению численности. Клетки водородиспользующего штамма M2^T полностью погибли после суммарного облучения 202.1 Дж/см².

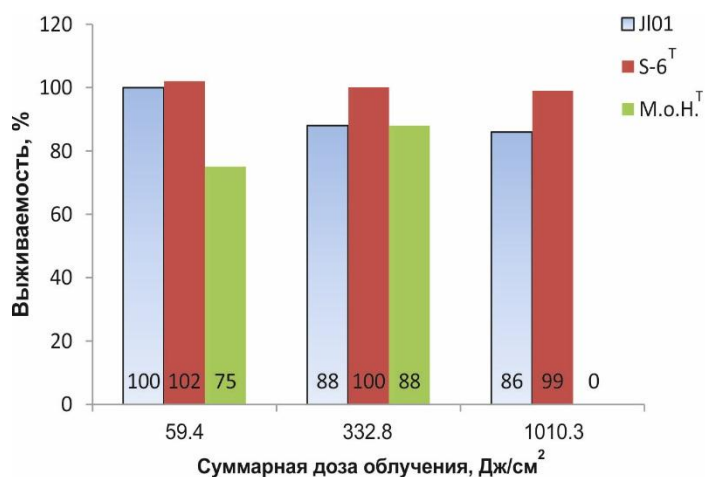


Рис. 12. Выживаемость метаногенных штаммов при различных режимах УФ-облучения. Все тесты проводились в трех повторностях.

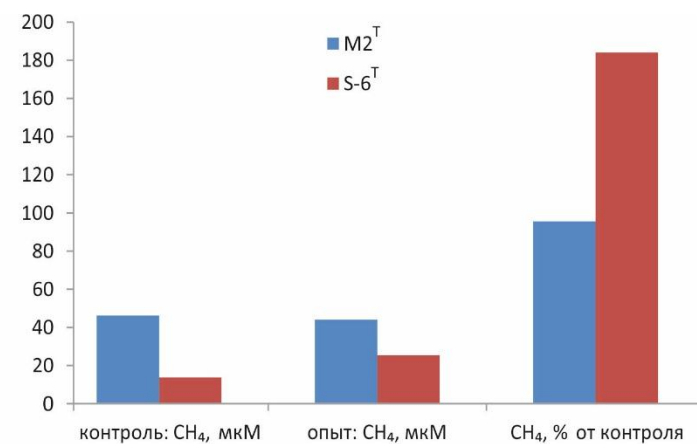


Рис. 13. Образование метана штаммами *M. arcticum* M2^T и *M. mazei* S-6^T после вакуумирования относительно контрольных вариантов. Все тесты проводились в пяти повторностях.

Влияние **вакуумирования** (10⁻⁵ атм, 15 мин) на выживаемость трех штаммов метаногенов, показало, что после воздействия вакуумом штамм S-6^T продуцировал метана значительно больше, чем в контроле (рис. 13), а штамм M2^T – на уровне контроля. Исследованный штамм JL01 не пережил условия эксперимента.

Существование в криобиосфере Земли жизнеспособных микроорганизмов открыло новые перспективы создания концептуальных моделей пространственных и временных границ на планетах криогенного типа (Гиличинский, 2002). 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. arcticum* M2^T и *M. mazei* штаммы S-6^T и JL01 сохраняли жизнеспособность после всех исследованных режимов УФ-облучения, а штамм S-6^T переносил 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. 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 ранее неизвестных 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 что численность анаэробных прокариот составляла от 0.2 до 25% от общей численности популяции микроорганизмов.
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 рНК 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. algoriphilum* 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 метанобразующие 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 криопэггов 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 криопэггов 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 криопэггов, 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 публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. **Щербакова В.А.**, Образцова А.Я., Лауринавичюс К.С., Котельникова С.В., Акименко В.К., Навоа М.К., Круз М. Физиологические свойства термофильных метаносарцин, выделенных из активного ила метантенков. Микробиология, 1991. Т. 60. № 3. С. 466-471.
2. **Щербакова В.А.**, Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Влияние окислительно-восстановительного потенциала среды на образование метана термофильными метаногенами. Микробиология, 1997. Т.66. №6. С. 767-772.
3. **Щербакова В.А, Вайнштейн М.Б.** Образование метана сульфатвосстанавливающей бактерией *Desulfosarcina variabilis*. Микробиология, 2000. Т. 69 №3. С. 341-344.
4. Ривкина Е.М., Лауринавичюс К.С., Гиличинский Д.А., **Щербакова В.А.** Метанобразование в вечномерзлых отложениях. Докл. АН, 2002. Т. 383. № 6. С. 830-833.
5. 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.

6. Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J., Tiedje J., **Shcherbakova V.**, Gilichinsky D. Microbial life in permafrost. *Advan. Space Res.*, 2004. V.33. P. 1215-1221.
7. Ривкина Е.М., **Щербакова В.А.**, Лауринавичус К.С., Холодов А.Л., Гиличинский Д.А. Метанобразование в вечномёрзлых отложениях различного возраста. Эмиссия и сток парниковых газов на территории Северной Евразии (под ред. Н.П. Лаверова). 2004. Пущино С. 220-226.
8. Гиличинский Д.А., Ривкина Е.М., **Щербакова В.А.**, Лауринавичюс К.С., Комаров И.А., Волков Н.Г. Криопэги и их обитатели - модель для астробиологии. *Криосфера Земли*, 2003. Т.7. № 3. С 73-84.
9. **Shcherbakova V.**, Rivkina E., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Gilichinsky D. Physiological characteristics of bacteria isolated from water brines within permafrost. *Int. J. Astrobiol.*, 2004. V. 3 (1). P. 37-43.
10. Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., **Shcherbakova V.**, Petrovskaya L., Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsyna S., Fattakhova R., Tiedje J. Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005. V.53. P.117-128.
11. **Shcherbakova V.**, Chyvil'skya N., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Osipov Yu., Lysenko A., Gilichinsky D., Akimenko V. Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp.nov. *Extremophiles*, 2005. № 9. P. 239-246.
12. Трутко С.М., Дорофеева Л.В., **Щербакова В.А.**, Чувильская Н.А., Лауринавичюс К.С., Бинюков В.И., Островский Д.Н., Хинтц М., Виснер И., Иомаа Х., Акименко В.К. Распространение немевалонатного и мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов среди бактерий различных систематических групп. *Микробиология*, 2005. Т. 74. № 1 С. 185-190.
13. Gilichinsky D., Wilson G., Friedmann E. I., McKay C. P., Sletten R., Rivkina E., Erokhina L., Ivanushkina N., Kochkina G., **Shcherbakova V.**, Soina V., Spirina E., Vorobyova E., Fyodorov-Davydov D., Hallet B., Ozerskaya S., Sorokovikov V., Laurinavichyus K., Shatilovich A., Chanton J., Ostroumov V., Tiedje J. Microbial Populations in Antarctic Permafrost: Implication for Astrobiology. *Astrobiology*, 2007. V.7 (2). P. 275-311.
14. Ривкина Е.М., Краев Г.Н., Кривушин К.В., Лауринавичюс К.С., Федоров-Давыдов Д.Г., Холодов А.Л., **Щербакова В.А.**, Гиличинский Д.А. Метан в вечномёрзлых отложениях северо-восточного сектора Арктики. *Криосфера Земли*, 2006. Т.10. С 23-41.
15. Rivkina E., **Shcherbakova V.**, Laurinavichius K., Pecheritsyna S., Krivushin K., Kraev G., Gilichinsky D. Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. *FEMS Microbial Ecology*, 2007. V. 61(1). P.1-15.
16. Печерицына С.А., **Щербакова В.А.**, Холодов А.Л., Акимов В.Н., Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Ривкина Е.М. Микробиологический анализ криопэгов Варандейского полуострова на побережье Баренцева моря. *Микробиология*, 2007. Т. 76. № 5. С. 694-701.

17. Suetin S.V., **Shcherbakova V.A.**, Chuvil'skaya N.A., Rivkina E.M., Suzina N.E., Lysenko A.M., Gilichinsky D.A. *Clostridium tagluense* sp.nov., psychrotolerant anaerobic spore-forming bacterium from Canadian permafrost. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2009. V.59. P.1421-1426.
18. **Щербакова В.А.**, Чувильская Н.А., Ривкина Е.М., Печерицына С.А., Суетин С.В., Лауринавичюс К.С., Гиличинский Д.А. Новая галотолерантная бактерия из криопэга в вечной мерзлоте: описание *Psychrobacter muriicola* sp.nov. Микробиология, 2009. Т. 78 № 1. С. 98-105.
19. **Щербакова В.А.**, Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Лауринавичюс К.С., Озерская С.М., Акименко В.К. Исследование роста грибов *Geomyces rannorum* в условиях анаэробноза. Микробиология, 2010. Т 79. № 6. С. 848-851.
20. 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. P. 455-459.
21. **Shcherbakova V.A.**, Rivkina E.M., Pecheritsyna S.A., Laurinavichius K., Suzina N.E., Gilichinsky D.A. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2011. V. 61. P. 144 - 147.
22. Печерицына С.А., Архипова О.В, Сузина Н.Е., Лысанская В.Я., Лауринавичюс К.С., **Щербакова В.А.** Внутриклеточный полисахарид анаэробного психрофила *Clostridium algoriphilum*. Микробиология, 2011. Т 79. №1. С. 1-7.
23. 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. P. 33-37.
24. Krivushin K.V., Rivkina E.M., Pecheritsina S.A., & **Scherbakova V.A.** Methanogens in Permafrost. Paleontological journal, 2012. V. 46 (9). P. 1070-1071.
25. Kondakova A.N., Novototskaya-Vlasova K.A., Drutskaya M.S., Senchenkova S.N., **Shcherbakova V.A.**, Shashkov A. S., Gilichinsky D.A., Nedospasov S.A., Knirel Y.A. 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.
26. Kondakova A.N., Novototskaya-Vlasova K.A., Shashkov A.S., Drutskaya M.S., Senchenkova S.N., **Shcherbakova V.A.**, Gilichinsky D.A., Nedospasov S.A., Knirel Y.A. Structure of an acidic polysaccharide isolated from *Psychrobacter maritimus* 3pS containing bacillosamine derivative. Carbohydrate Research, 2012. V.359. P. 7-10.
27. Kondakova A., Novototskaya-Vlasova K., Arbatsky N. Drutskaya M., **Shcherbakova V.**, Shashkov A., Gilichinsky D., Nedospasov S., Knirel Y. 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.
28. **Shcherbakova V.**, Chuvil'skaya N., Rivkina E., Demidov N., Uchaeva V., Suetin S., Suzina N., and Gilichinsky D. *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2013. V. 63. P. 4421-4427.
29. **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.

30. Troshina O., Oshurkova V., Suzina N., Machulin A., Ariskina E., Vinokurova N., Kopitsyn D., Novikov A. & **Shcherbakova V.** *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 2015. V.65. P. 4315-4322.
31. Buongiorno J., Bird J., Krivushin K., Oshurkova V., **Shcherbakova V.**, Rivkina E., Karen Lloyd K., and Vishnivetskaya T. Draft Genome Sequence of Antarctic Methanogen Enriched from Dry Valley Permafrost. Genome Announcements, 2016. 4(6), e01362-16.
32. **Shcherbakova V.**, Yoshimura Y., Ryzhmanova Y., Taguchi Y., Segawa T., Oshurkova V., & Rivkina E. Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost. FEMS Microbiology Ecology, 2016. V.92 (10). fiw135.

Тезисы основных докладов

1. **Щербакова В.А.**, Чувильская Н.А., Сузина Н.Е., Лауринавичюс К.С., Гиличинский Д.А. Новая анаэробная психрофильная бактерия из низкотемпературного рассола. Тезисы докл. Международной конференции «Консервация и трансформация вещества и энергии в криосфере Земли» 1-5 июня 2001 года. Пушино. 2001. С. 6.
2. Laurinavichius K., **Shcherbakova V.**, Rivkina E., Gilichinsky D., Tsapin A., Nealson K. Microorganisms into overcooled brines within permafrost: probably model of martian communities. Astrobiology expeditions 2002. St. Petersburg. P.132.
3. Gilichinsky D., **Shcherbakova V.**, Tsapin A., Rivkina E., Laurinavichius K., Nealson K., Fyodorov-Davudov D., Sorokovikov V. Water brine within permafrost - a new ecological niche for microorganisms on and beyond the Earth: the model for exobiology. Water in the Upper Martian Surface. Workshop. April 17-19. 2002. Potsdam. Germany. P. 120.
4. Печерицына С.А., **Щербакова В.А.**, Лауринавичюс К.С., Ривкина Е.М. Метанобразующие археи из вечномёрзлых грунтов. Биология-наука 21-го века. Сб. тезисов 7-й Пушинской школы-конференции молодых ученых. Пушино, 14-18 апреля 2002. С. 289.
5. Печерицына С.А., **Щербакова В.А.**, Чувильская Н.А., Сузина Н.Е., Ривкина Е.М., Лауринавичюс К.С. Бактерии-обитатели высокоминерализованных вод в вечной мерзлоте. Биология-наука 21-го века. Сб. тезисов 8-й Пушинской школы-конференции молодых ученых. Пушино. 20-24 мая 2004. С.157.
6. Архипова О.В., Печерицына С.А., **Щербакова В.А.**, Сузина Н.Е., Лысанская В.Я., Лауринавичюс К.С. Стратегии выживания микроорганизмов в экстремальных условиях: резервные вещества клетки. Биология-наука 21-го века. Сб. тезисов 8-й Пушинской школы-конференции молодых ученых. Пушино. 17-21 мая 2004. С.158.
7. Печерицына С.А., Архипова О.В., Лауринавичюс К.С., **Щербакова В.А.** Адаптация микроорганизмов из криопэга к условиям местообитания. Биология-наука 21-го века. Сб. тезисов 9-й Пушинской школы-конференции молодых ученых. Пушино. 18-22 апреля 2005. С. 207.
8. **Shcherbakova V.**, Rivkina E., Chuvilskaya N., Pecheritsina S., Laurinavichuis K. and Gilichinsky D. New psychrophilic bacteria from water brines within Arctic. International Conference on Arctic Microbiology Rovaniemi, Finland. March 22-25, 2004. P.28.
9. Rivkina E., **Shcherbakova V.**, Laurinavichius K., Gilichinsky D. Methane and methane generation in permafrost. International Conference on Arctic Microbiology Rovaniemi, Finland. March 22-25, 2004. P.20.

10. Pecheritsyna S., Arkhipova O., Suetin S., Laurinavichuis K., **Shcherbakova V.** Bacteria from supercooled water brine within permafrost and their adaptation to environment. 2nd European Conference on Permafrost, Potsdam, Germany, 2005. P. 48.
11. Pecheritsyna S., **Shcherbakova V.**, Arkhipova O., Rivkina E., Laurinavichuis K. Adaptation of the arctic cryopeg bacteria to the environment. The 9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology. Helsinki. 2005. P. 82.
12. **Shcherbakova V.**, Rivkina E., Chuvilskaya, N., Pecheritsyna S., Suetin S., Laurinavichuis, K and Gilichinsky D. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms from water brines within permafrost. The 9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology. Helsinki. 2005. P.81.
13. Krivushun K., **Shcherbakova V.**, Vorobyeva E., Rivkina E. Methanogenic archaea isolated from Arctic permafrost. Int. Conference on Alpine and Polar Microbiology. Austria. Innsbruck. 27-31 March. 2006, P.71.
14. Ryzhmanova Y., Troshina O., Laurinavichuis K., Rivkina E., **Shcherbakova V.** Development and application of a real-time PCR method for characterization of the permafrost anaerobic microbial communities. EANA meeting. 6-8 September 2010, Pushchino. P. 29.
15. Krivushin K., Rivkina E., Pecheritsyna S., **Shcherbakova V.** Methanogens in permafrost. 10th European Workshop on Astrobiology EANA'10. 6-8 September 2010, Pushchino. P. 26.
16. Yoshimura Y., Obata S., Takeuchi A., **Shcherbakova V.**, Hanada Y., Hoshino T., Tsuda S., Kondo H. Antifreeze activities of an anaerobic bacterium isolated from permafrost. 2nd International Ice-Binding Protein Conference, August 4-7, 2014. Sapporo. Japan. 2014. P. 27.
17. Ryzhmanova Y., **Shcherbakova V.** Molecular detection of the sulfate-reducing bacteria in extreme ecosystems and isolation of a new psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from Arctic cryopeg. 10th International Congress on Extremophiles, September 7-11, Saint Petersburg. P. 133.
18. **Shcherbakova V.**, Yoshimura Y., Taguchi Y., Segawa T., Oshurkova O., Rivkina E. Archaeal communities of Arctic permafrost: an unexpected diversity. 10th International Congress on Extremophiles, September 7-11, Saint Petersburg. P. 85.
19. Oshurkova V., Rivkina E., **Shcherbakova V.** The search of methanogens in Arctic and Antarctic permafrost. Polar and Alpine Microbiology Conference, České Budějovice. Czech Republic. 2015. P.103.
20. **Shcherbakova V.**, Ryzhmanova Y., Oshurkova V., Rivkina E. Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria in permafrost ecosystems; competition or coexistence? Permafrost in XXI century: Basic and Applied Researches International Conference. Pushchino, Moscow region, Russia. 2015. P. 95-96.
21. **Shcherbakova V.**, Ryzhmanova Y., Rivkina E. Sulfate-reducing bacteria in Arctic cryopegs. Polar and Alpine Microbiology Conference, České Budějovice. Czech Republic, 2015. P.61.
22. **Shcherbakova V.**, Alexeenko N., Mironov V., Rivkina E., Yoshimura Y. New Psychrophilic Clostridia From Polar Environments. 11th International Congress on Extremophiles, Kyoto, Japan, 12-17 September 2016. P. 18.
23. **Щербакова В.А.** Анаэробные бактерии и археи из полярных регионов: разнообразие и биотехнологический потенциал. IV Международная конференция Микробное разнообразие: ресурсный потенциал, Москва, 23 ноября 2016 г. С. 38.

24. Трошина О.Ю., Ошуркова В., **Щербакова В.А.** Сравнительная геномика бактерий *Sphaerochaeta*. Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса. Пушино, 17-18 октября 2017 г. С. 129-130.
25. Oshurkova V., **Shcherbakova V.**, Rivkina E. Bioprospecting of methanogenic archaea in Arctic and Antarctic permafrost. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017) Valencia. Spain. 2017, P. 483.
26. **Shcherbakova V.A.** Anaerobic bacteria and archaea in permafrost: life under extreme energy limitation. International conference Earth's Cryosphere: past, present and future. Pushchino, Russia, June 4-8, 2017. P.78-79.