

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

На правах рукописи

ОШУРКОВА ВИКТОРИЯ ИГОРЕВНА

**МЕТАНОБРАЗУЮЩИЕ АРХЕИ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ
ОТЛОЖЕНИЙ АРКТИКИ**

Специальность: 03.02.03 – Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Щербакова В. А.

Пущино - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Обзор литературы.....	10
ГЛАВА 1. Вечная мерзлота как экстремальное место обитания для микроорганизмов.....	10
1.1 Характеристика и структура.....	10
1.2 Микробное разнообразие в экосистемах многолетнемерзлых отложений	14
1.3 Метаболическая активность <i>in situ</i>	19
ГЛАВА 2. Домен <i>Archaea</i>: разнообразие и распространение	23
2.1 Происхождение и эволюция.....	23
2.2 Классификация архей	26
2.3 Методы изучения архейного разнообразия.....	34
2.4 Некультивируемое разнообразие архей в вечной мерзлоте.....	36
ГЛАВА 3. Метанобразующие археи.....	38
3.1 Общая характеристика и распространение.....	38
3.2 Современные представления о филогении метаногенов.....	43
3.3 Метаболическая кооперация метаногенов с другими микроорганизмами..	46
3.4 Метаногенные археи из постоянно холодных экосистем.....	48
3.5 Метаногенные археи – модельные объекты для астробиологических исследований.....	51
Заключение по обзору литературы.....	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	55
ГЛАВА 4. Материалы и методы исследования.....	55
4.1 Район исследования и отбор проб.....	55
4.2 Объекты исследования.....	56
4.3 Среды и условия культивирования.....	57
4.4 Микроскопические методы.....	58
4.5 Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов.....	59
4.6 Аналитические методы.....	60

4.6.1 Определение уксусной кислоты.....	60
4.6.2 Определение водорода.....	60
4.6.3 Определение белка биомассы.....	60
4.6.4 Определение каталазы и оксидазы.....	60
4.6.5 Определение липидного состава клеток.....	61
4.6.6 Анализ жирнокислотного состава клеток.....	61
4.7 Эксперименты по влиянию перхлоратов на рост метаногенов.....	61
4.8 Молекулярно-генетические методы.....	63
4.8.1 Выделение и очистка ДНК.....	63
4.8.2 Амплификация генов 16S рРНК и <i>mcrA</i>	64
4.8.3 Создание клоновых библиотек генов 16S рРНК и <i>mcrA</i>	65
4.8.4 Секвенирование.....	65
4.8.5 Статистический анализ последовательностей.....	65
4.8.6 Филогенетический анализ	65
4.8.7 Определение и расчет содержания Г+Ц пар в ДНК.....	66
4.8.8 ДНК-ДНК гибридизация.....	66
4.9 Времяпролетная МАЛДИ-масс спектрометрия.....	66
ГЛАВА 5. Результаты и обсуждение.....	68
5.1 Исследование разнообразия архей в многолетнемерзлых образцах различного возраста	68
5.1.1 Создание клоновой библиотеки гена 16S рРНК	69
5.1.2 Создание клоновой библиотеки гена <i>mcrA</i>	73
5.2 Описание нового вида метаносарцины.....	77
5.3 Бактериальный спутник ' <i>Methanosarcina gilichinskiia</i> ' JL01 ^T	83
5.3.1 Описание <i>Sphaerochaeta associata</i> GLS2 ^T sp.nov.....	84
5.3.2 Влияние <i>S. associata</i> GLS2 ^T на рост и метаногенез ' <i>M. gilichinskiia</i> ' JL01 ^T	93
5.4 Метанобразующие археи мерзлоты – модельные организмы для астробиологии.....	94

5.4.1 Определение ингибирующих концентраций перхлоратов на рост метаногенных архей.....	95
5.4.2 Образование метана в культуральной среде, содержащей перхлораты...	96
5.4.3 Влияние перхлоратов на морфологию клеток <i>M. arcticum</i> M2 ^T	101
5.5 Идентификация метаногенных архей с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
Приложение 1.....	151
Приложение 2.....	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Низкотемпературные экосистемы играют важную роль в формировании климата Земли и баланса парниковых газов в атмосфере. Тундровая зона, в частности, является важным источником биогенного метана. В дополнение к сезонному оттаивающему верхнему слою большое количество метана обнаружено в толщах многолетнемерзлых отложений (ММО), так называемой «вечной мерзлоте», которые никогда не оттаивали после замерзания (Corradi *et al.*, 2005; Schuur *et al.*, 2015). В настоящее время этот метан выведен из биогеохимического цикла углерода (Gilichinsky *et al.*, 1997; Rivkina *et al.*, 2001). Эксперименты с радиоактивно мечеными субстратами ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ и $\text{Na}^{14}\text{CH}_3\text{CO}_2$) показали, что метаногенез может осуществляться в образцах арктических многолетнемерзлых отложений (ММО) при отрицательных температурах до $-16,5\text{ }^\circ\text{C}$ (Rivkina *et al.*, 2002; Rivkina *et al.*, 2004). Биогенное происхождение обнаруженного в ММО метана было подтверждено изотопным составом углерода (Rivkina *et al.*, 2007), который был легким (-64 до -99 ‰).

Метанобразующие археи играют ключевую роль в процессе анаэробного разложения органических веществ в отсутствие таких акцепторов, как нитраты, сульфаты, Fe (III) и Mn (IV), которые обычно поддерживают более высокий окислительно-восстановительный потенциал в окружающей среде. Эти микроорганизмы участвуют в образовании биогенного метана в различных местах обитания, таких как болота, рисовники, рубец жвачных животных, свалки бытовых отходов и донные отложения (Hedderich and Whitman 2013; Costa and Leigh 2014). Активное изучение разнообразия и распределения архей, включая метаногенов, в многолетнемерзлых экосистемах началось приблизительно 25 лет назад. Применение культивируемых методов позволило идентифицировать и описать новые метаногенные виды родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium* в плиоценовой и плейстоценовой вечной мерзлоте, которые ответственны за образование метана в экстремальных условиях ММО (Rivkina *et al.*, 2007; Krivushin *et al.*, 2010; Shcherbakova *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2013). Большая часть исследований некультивируемого разнообразия архей в мерзлых почвах и вечной

мерзлоте (Høj *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2009; Blake *et al.*, 2015) не обнаруживали метаногенных архей в изученных образцах. Недавно опубликованные данные, полученные в результате метагеномного секвенирования двух образцов вечномёрзлых осадков, позволили предположить, что состав архейного сообщества и наличие в нем метаногенов определяется происхождением ММО (Krivushin *et al.*, 2015; Rivkina *et al.*, 2016).

Большинство планет Солнечной системы имеет криогенный характер, то есть физико-химические условия на них наиболее близки к условиям криосферы Земли. Поэтому вечномёрзлые грунты являются уникальной моделью такого внеземного местообитания для живых организмов (Гиличинский, 2002; Демидов *и др.*, 2012), а выделенные из ММО микроорганизмы могут быть хорошей моделью для изучения возможной инопланетной жизни. Обнаружение в атмосфере Марса метана привлекло внимание исследователей к метаногенным автотрофным археям, как модельным объектам, в решении проблем астробиологии (Kendrick and Kral, 2006; Altheide and Kral, 2008; Kral *et al.*, 2011).

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы было исследование состава архейных микробных сообществ образцов многолетнемёрзлых отложений Арктики различного возраста и особенностей биологии метаногенных изолятов, выделенных из мёрзлых отложений.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- 1) Исследование некультивируемого разнообразия архей в образцах многолетнемёрзлых отложений Арктики.
- 2) Выделение и характеристика метанобразующей археи и бактериального спутника из метаногенной бинарной культуры, полученной в результате длительной инкубации ММО голоценового возраста при 15°C.
- 3) Исследование влияния бактериального спутника на метаногенез чистых культур метаногенов различного происхождения.
- 4) Изучение особенностей роста метанобразующих архей мерзлоты как модельных организмов для астробиологии.

- 5) Оценка возможности идентификации метанобразующих архей методом времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые исследовано некультивируемое разнообразие архей в многолетнемерзлых отложениях Арктики различного возраста. Охарактеризованы новые виды психроактивного метаногена '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01^T и его бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2^T, выделенных из ММО голоценового возраста. Полученные результаты расширяют представления о микробном разнообразии вечной мерзлоты и биологии психрофильных и психротрофных бактерий.

Исследовано влияние перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост и метаногенез метаногенных архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что метаногены из мерзлоты оказались более устойчивы к действию этих окислителей, кроме того обнаружены свидетельства о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана.

Проведен МЛДИ масс-спектрометрический анализ метанобразующих архей фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов. Показано, что данный метод может использоваться для экспресс-определения таксономической принадлежности новых метанобразующих архей.

Практическое значение. Изоляты адаптированных к холоду бактерий представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих природу веществ в холодном климате, а также как источники холодоактивных ферментов, используемых в пищевой промышленности, при очистке сточных вод, и в молекулярной биологии. Созданная база белковых профилей метаногенных архей может использоваться для идентификации новых изолятов.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на международной конференции The 10th International Congress on Extremophiles (Санкт-Петербург, Россия, 2014), 19-ой и 21-ой Международной Пущинской

школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2015; 2017), 6-й международной конференции «Polar and Alpine Microbiology» (Ческе-Будеевице, Чехия, 2015), 5-ой Всероссийской конференции молодых ученых "Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы" (Улан-Удэ, Бурятия, 2016), 7-ом Европейском микробиологическом конгрессе FEMS (Валенсия, Испания, 2017).

Публикации. Материалы диссертации содержатся в 9 печатных работах: 3 экспериментальных статьях, в том числе в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК - 2, и 6 тезисах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 158 страницах машинописного текста и включает 28 рисунков и 15 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей 2 главы (методы и результаты и обсуждения), заключения, выводов, списка литературы, который содержит 305 наименования, и 2 приложений.

Место проведения работы. Основная часть работы выполнялась в Лаборатории анаэробных микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Получение клоновых библиотек проводили в Национальном институте полярных исследований, Токио, Япония.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Щербаковой В.А. за предложенную тему, внимание и неоценимую помощь в работе и обсуждении результатов, а также всему коллективу лаборатории анаэробных микроорганизмов за практическую помощь, ценные советы и поддержку при написании диссертации. Особую благодарность автор выражает сотрудникам ИБФМ РАН: с.н.с., к.б.н. Аriskиной Е.В. за помощь в определении Г+Ц состава ДНК и проведении анализа ДНК-ДНК гибридизации; с.н.с., к.б.н. Сузиной Н.Е. за помощь в проведении микроскопических исследований; с.н.с., к.б.н. Винокуровой Н.Г. за помощь в определении липидов; с.н.с., к.б.н. Лауринавичусу К.С. за помощь в проведении МАЛДИ МС анализа. Автор также благодарна Новикову

А.А. (ГУ нефти и газа им. Губкина) за помощь в определении жирнокислотного состава клеточных стенок и к.г.-м.н. Ривкиной Е.М. (лаборатория криологии почв ИФХиБПП РАН) за предоставленные образцы многолетнемерзлых отложений и плодотворное обсуждение полученных результатов. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ 04-15-08612а).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Вечная мерзлота как экстремальное место обитания для микроорганизмов

1.1 Характеристика и структура

По оценкам специалистов многолетнемерзлые отложения («вечная мерзлота») занимают около 25% земной поверхности и в классическом понимании представляют собой отложения, температурный режим которых сохраняется при 0°C или ниже на протяжении как минимум 2 лет (Gilichinsky, 2002; Jansson and Tas, 2014). Россия занимает первое место в мире (Ran *et al.*, 2012) по площади многолетнемерзлых отложений (ММО), которые составляют около 65% ее территории. Всю совокупность вечномерзлых пород принято называть криосферой, или криолитосферой.

Вечную мерзлоту от других низкотемпературных сред, таких как морской лед, ледники и глубоководные океаны, отличает то, что она гетерогенна по своей структуре и в разных географических точках представлена разными типами. Кроме того, имеются различия не только в структуре ММО, а также в их возрасте и содержании органического вещества. В зависимости от температуры и глубины залегания вечную мерзлоту разделяют на несколько слоев. Активный слой варьирует от нескольких сантиметров в Арктике до 2-3 метров в субарктических регионах и подвергается сезонным циклам замораживания-оттаивания, а также характеризуется интенсивными физико-химическими процессами (Остроумов, 2004). Температурный режим этого слоя составляет от +15 до -35°C. За активным слоем следует переходная зона, представляющая собой мерзлые отложения толщиной от 10 до 20 метров с сезонными температурными колебаниями от 0 до -15°C, и отделяющая активный слой от более глубокого и стабильного горизонта ММО, температурный режим которого составляет от -5 до -10°C (French 1996; Shur *et al.*, 2008; Jansson and Tas, 2014).

Внутри вечномёрзлых грунтов существуют различные относительно обособленные структуры, такие как талики, ледяные жилы и криопэги, формирование которых зависит от температурных условий (Рисунок 1).

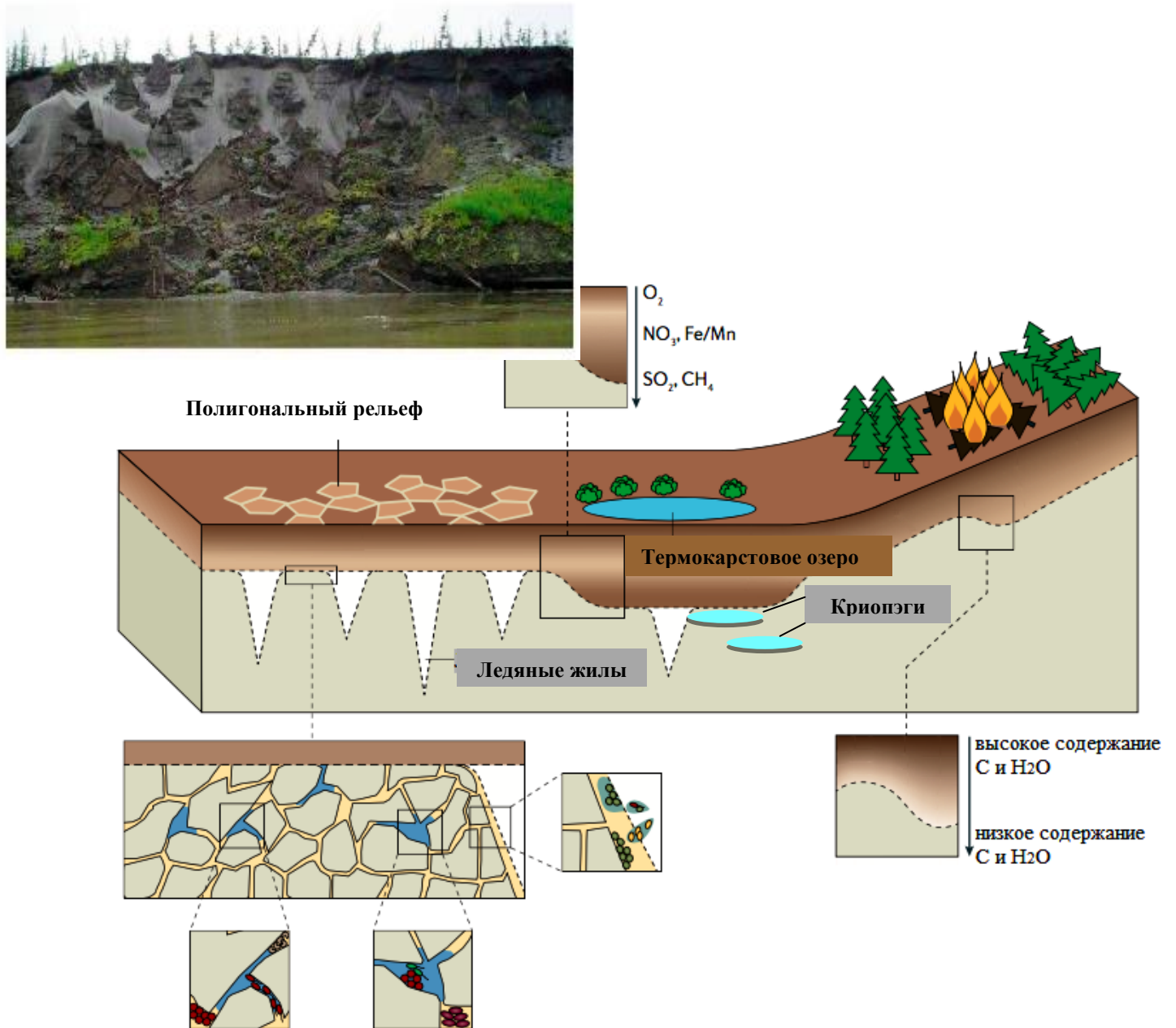


Рисунок 1. Структура многолетнемерзлых отложений, модифицировано по Jansson and Tas, 2014

Талики - незамерзающие участки породы внутри мерзлой толщи, имеющие разное происхождение. Ледяные жилы обычно встречаются в тундровых экосистемах и представляют собой трещины, которые образуются в холодный зимний сезон, а весной заполняются талой водой. Повторное растрескивание, наполнение водой и замерзание приводит к образованию полигонального микрорельефа с ледяными клиньями шириной в несколько метров и несколькими десятками метров в глубину. Такая структура сохраняется на протяжении геологического времени и называется ледовым комплексом (van Everdingen, 2005). Большой интерес у исследователей вызывает позднеплейстоценовый ледовый комплекс (едома) восточно-сибирских прибрежных равнин (Лена-Анабар, Яна-Индигирка и Колымская низменность) (Schirrmeister *et al.*, 2011). Анализ образцов данного комплекса, возраст которых составляет примерно 28000 лет, показал присутствие метана в концентрации $1,0 \text{ ммоль кг}^{-1}$ (Rivkina *et al.*, 2016).

Еще одной структурой многолетнемерзлых отложений являются криопэги - высокоминерализованные незамерзшие грунты и линзы свободной воды, находящиеся в толще многолетнемерзлых пород и характеризующиеся постоянно отрицательной температурой и высокой соленостью (van Everdingen 2005; Gilichinsky *et al.*, 2005) (Рисунок 1). Эти структуры широко распространены в Арктике. Образование криопэгов произошло в результате криогенной метаморфизации пород и подземных вод. Наиболее изучен криогенный метаморфизм соленых вод морского происхождения. Гидрохимический анализ криопэгов, образующихся в породах с морским типом засоления, показал, что криогенная метаморфизация пород и подземных вод происходила при температуре ниже современных температур вмещающих пород. (Фотиев, 1997, 2009).

Сезонное изменение температуры почвы имеет большое влияние на доступность грунтовой воды. Наличие незамерзающей воды является существенным биофизическим требованием для выживания микроорганизмов в вечной мерзлоте. Даже при отрицательных температурах в вечномерзлых грунтах

присутствует вода в жидкой фазе. Она существует в виде тонких пленок, окружающих частицы грунта или льда. Толщина пленок составляет от 15 нм при -1.5°C до 5 нм при -10°C (Rivkina *et al.*, 2000). Было высказано предположение, что эти пленки защищают живые клетки от повреждения кристаллами льда и служат в качестве питательной среды (Gilichinsky, 2002).

Температура в ММО Арктики варьирует от 0 до -17°C , в то время как в Антарктике от -18 до -27°C . Содержание органического вещества колеблется от 0,35 до 10%, pH нейтральный, окислительно-восстановительный потенциал находится в пределах от +40 до -256 мВ, соленость не превышает 5-7%, льдистость варьирует от 12 до 70% и зависит от наличия и мощности ледяных жил.

Что касается исследованных проб вечномерзлых грунтов Антарктики, то они содержат намного меньше органического вещества, имеют более щелочной pH и широкий диапазон изменения редокс-потенциала (Таблица 1). Возраст как арктической, так и антарктической мерзлоты варьирует в интервале от нескольких тысяч до нескольких миллионов лет. (Gilichinsky, 2002; Gilichinsky and Rivkina, 2011).

Таблица 1 Физико-химические свойства вечномерзлых грунтов.

Географическое положение	Глубина, м	Возраст	T, $^{\circ}\text{C}$	pH	C _{орг} , % от сухого веса грунта	Ссылка
Мерзлота Арктики, Колымская низменность, Сибирь	0-100	От современного до 5 млн. лет	-7...-11	5.6–7.8	0.35-10	Gilichinsky <i>et al.</i> , 2003
Вечномерзлые грунты Арктики, Канада	0-15	От современного до 20 тыс. лет	-10...-17	6.5	2.19	Steven <i>et al.</i> , 2006
Вечномерзлые грунты Антарктики	0-17	150 тыс. – 2 млн. лет	-18...-27	7.8–9.8	0.043	Gilichinsky <i>et al.</i> , 2007

Таким образом, вечная мерзлота является природной многофазной экосистемой, состоящей из различных по своим свойствам компонентов, препятствующих движению микроорганизмов и смешиванию субстратов, что стимулирует образование пространственно отдельных микроколоний, которые подлежат адаптации и микроэволюционным процессам.

1.2 Микробное разнообразие многолетнемерзлых отложений.

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

К классическим методам идентификации микроорганизмов относятся выделение чистых культур и установление их таксономического статуса. С помощью данных методов были получены культивируемые микроорганизмы важных физиологических групп, например, аэробные и анаэробные гетеротрофы, метаногены, метанотрофы, нитрифицирующие и азотфиксирующие бактерии, сульфатредукторы и ацетогены. Основными и часто идентифицируемыми родами являются *Acetobacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Methanosarcina*, *Methylobacter*, *Micrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Streptomyces* (Gilichinsky *et al.*, 1995; Kotsyurbenko *et al.*, 1995; Omelchenko *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Simankova *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Wartiainen *et al.*, 2006a).

Общее количество бактерий, определенное путем прямого счета под микроскопом составило 10^5 – 10^6 для проб антарктических грунтов (Cowan *et al.*, 2002; Gilichinsky *et al.*, 2007), 10^7 для проб арктических грунтов Канады (Steven *et al.*, 2004) и 10^3 – 10^8 кл/г для проб арктических грунтов Сибири (Rivkina *et al.*, 1998; Gilichinsky *et al.*, 2002).

Таблица 2. Общий счет и количество жизнеспособных бактерий в вечной мерзлоте различной географической локализации.

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

Н.о* - не определяли.

Количество жизнеспособных бактерий, определенное, главным образом, чашечным методом при посеве на богатые среды, варьировало от 0 до 10^8 кл/г (Таблица 2).

В последние годы достигнут значительный прогресс в исследовании культивируемой части прокариотных микробных сообществ ММО, особенно арктических регионов, и выделен целый ряд психрофильных и психроактивных бактерий и архей из вечномерзлых грунтов и криопэгов (Таблица 3).

Таблица 3. Психрофильные и психроактивные прокариоты, выделенные из экосистем ММО Арктики.

№ /п	Микроорганизмы	Температура, °C	Источник выделения	Ссылка
Bacteria				
1.	<i>Clostridium tagluense</i> 121A ^T	15	Арктика, Канада	Suetin <i>et al.</i> , 2009
2.	<i>Clostridium alboriphilum</i> 14D1 ^T	5-6	Арктика, Россия	Shcherbakova <i>et al.</i> , 2005
3.	“ <i>Psychrobacter muriicola</i> ” 2pS ^T	16-18	Криопэг, Колымская низменность, Россия	Щербакова <i>и др.</i> , 2009
4	<i>Psychrobacter arcticus</i> 273 ^T	20-22	Арктика, Россия	Bakermans <i>et al.</i> , 2006
5	<i>Psychrobacter cryohalalensis</i> K5 ^T	22-23	Криопэг, Колымская низменность, Россия	Bakermans <i>et al.</i> , 2006
4.	<i>Desulfovibrio arcticus</i> B15 ^T	24	Криопэг, п-ов Варандей, Россия	Pecheritsyna <i>et al.</i> , 2012
6	<i>Celerinatantimonas yamalensis</i> C7 ^T	18-22	Криопэг, п-ов Ямал, Россия	Shcherbakova <i>et al.</i> , 2013
Archaea				
1.	<i>Methanobacterium arcticum</i> M2 ^T	37	Арктика, Россия	Shcherbakova <i>et al.</i> , 2011
2.	<i>Methanobacterium veterum</i> MK4 ^T	24-28	Арктика, Россия	Krivushin <i>et al.</i> , 2010
3	<i>Methanosarcina solidgelidi</i> SMA-21 ^T	24-28	Арктика, Россия	Wagner <i>et al.</i> , 2013

Постоянное воздействие отрицательных температур и определенные основные физико-химические параметры делают мерзлоту одной из стабильных и сбалансированных экосистем (Vorobyova *et al.*, 1997). Это определяет необходимость рассматривать традиционные физико-химические параметры мерзлоты как абиотические, которые способствуют сохранению жизнеспособности и обеспечивают формирование микробных сообществ, реализующих неизвестные способы физиологической и биохимической адаптации к длительному переохлаждению.

Восстановленные условия создают преимущества для сохранения таких анаэробов, как ацетокластические и водородпотребляющие метаногены, сульфат – и Fe (III)- редукторы и денитрификаторы (Gilichinsky *et al.*, 2008). В древних толщах вечной мерзлоты в большом количестве были обнаружены денитрификаторы и ацетокластические метаногены (Rivkina *et al.*, 1998). Отложения древней вечной мерзлоты содержат также большое разнообразие метанотрофных бактерий (например, *Methylobacterium*, *Methylobacter*), способных окислять и ассимилировать метан при отрицательных температурах (Trotsenko and Khmelenina, 2005). Бактерии родов *Exiguobacterium* (грамположительных и факультативно анаэробных) и *Psychrobacter* (грам-отрицательные факультативно-анаэробные виды) неоднократно выделяли из образцов древней сибирской вечной мерзлоты (Bakermans *et al.*, 2006; Vishnivetskaya *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009). Представители этих родов приспособлены к долгосрочному замораживанию (при – 12°C, когда внутриклеточная вода не замерзает), они растут при отрицательных температурах и проявляют некоторые свойства психрофилов, такие как состав клеточных мембран и льдообразующая активность (Ponder *et al.*, 2005).

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

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

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

Поскольку при культивировании микроорганизмов из таких экстремальных экосистем возникают трудности, то в настоящее время стали широко применяться методы, исключаящие культивирование. Для оценки микробного разнообразия ММО недавно стал применяться метагеномный подход (Krivushin *et al.*, 2015; Rivkina *et al.*, 2016). Наиболее распространены в исследованных образцах девять бактериальных и одна архейная филы: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, и *Verrucomicrobia*. Среди секвенированных последовательностей были обнаружены также эукариоты и вирусы.

Таким образом, вечная мерзлота является потенциальным источником для выделения широкого разнообразия холодоустойчивых прокариот, обладающих привлекательными биотехнологическими свойствами.

1.3 Метаболическая активность *in situ*

Первые свидетельства жизнеспособности микроорганизмов в мерзлоте появились в двадцатом столетии. Большинство исследований микроорганизмов проводилось в Арктических и Антарктических мерзлых породах, которые не оттаивали в течение многих тысяч лет. Одни из самых древних микроорганизмов были найдены на сибирских равнинах, возраст которых соответствовал возрасту мерзлоты (около 3 млн лет) (Gilichinsky, 1998). С тех пор накоплен значительный материал по способности некоторых микроорганизмов сохранять жизнеспособность в течение длительного времени при сравнительно высоких отрицательных температурах, однако вопрос об их метаболическом статусе в естественных условиях остается актуальным. Частично на этот вопрос могут ответить исследования физиологических свойств чистых культур микроорганизмов, выделенных из вечной мерзлоты. Но, в этом случае условия культивирования далеки от естественных и учитывается, как правило, только один параметр - отрицательная температура. Вечная мерзлота является идеальным объектом для поиска ответа на вопрос, как долго могла сохраняться жизнь, поскольку организмы, живущие в ней, реализуют еще не вполне изученную стратегию самосохранения и криоконсервации, которая позволяет сохранять жизнеспособность в течение геологического времени.

В ряде экспериментов было показано, что многие выделяемые из мерзлоты микроорганизмы имеют оптимум роста при 20°C, т. е. они психротолерантны (Gounot, 1986; Morita and Morita, 1997). В то же время другие представители культивируемых микроорганизмов были способны к росту и при отрицательных температурах, близких температурам естественных местообитаний. Так, при характеристике изолятов аэробных гетеротрофных бактерий из проб арктических вечномерзлых грунтов Канады было показано, что 20% изолятов способны к росту по крайней мере при -5°C (Steven and Whyte, неопубликованные данные, цит. по Steven *et al.*, 2006). *Psychrobacter cryohalalensis* 5, выделенный из проб криопэгов Колымской низменности, был способен к росту при -10°C. Другие изоляты из того же местообитания, не способные к видимому росту при этой

температуре, восстанавливали резазурин, то есть проявляли дыхательную активность (Bakermans *et al.*, 2003). К росту при отрицательных температурах были способны анаэробные бактерии, выделенные из арктических ММО и криопэгов (Shcherbakova *et al.*, 2005; Suetin *et al.*, 2009; Pecheritsyna *et al.*, 2012).

Помимо самих микроорганизмов в мерзлоте также сохраняются и продукты их жизнедеятельности: ферменты (Vorobyova *et al.*, 1997), биогенные газы (Rivkina *et al.*, 1992, 2007) и ДНК (Willerslev *et al.*, 2004; Vishnivetskaya *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). В экспериментах с ^3H -тимидином и ^3H -лейцином установлена способность микроорганизмов из антарктического льда к новообразованию ДНК и белков при температуре до -17°C (Carpenter *et al.*, 2000). Теми же методами показано, что представители рода *Psychrobacter*, выделенные из льда, могут размножаться при температуре -15°C (Christner, 2002). Обнаружение в мерзлоте таких соединений, как сульфидов железа и нитритов (Janssen and Bock, 1994), указывает на возможность участия микроорганизмов в биогеохимических реакциях при температурах ниже 0°C . Эксперименты по изучению включения ^{14}C - ацетата в липиды микроорганизмов в образце вечной мерзлоты при разных температурах показали значимое включение метки от 5 до 20°C . Скорость включения резко уменьшалась при -1.5°C - температуре, при которой начиналось образование льда в образце. Кроме того, скорость и количество включенного меченого ацетата коррелировали с толщиной пленок жидкой воды в образце (Rivkina *et al.*, 2000). Сообщество криопэгов Колымской низменности было способно окислять ^{14}C -глюкозу при отрицательных температурах вплоть до -15°C (Gilichisky *et al.*, 2003).

В образцах вечномерзлых пород было изучено образование метана природным сообществом метанобразующих архей из $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ и $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$ в диапазоне температур от 5 до -16.5°C (Ривкина и др., 2002). При каждой температуре и для каждого субстрата было проанализировано не менее пяти образцов. Все эксперименты сопровождалось контролями, в которых микроорганизмы были убиты автоклавированием до введения в них радиоактивного субстрата. Результаты показали, что скорость образования метана

при снижении температуры от 5 до -1.8°C уменьшалась приблизительно в 2 раза, а в диапазоне температур от -1.8 до -16.5°C - в 100 раз. Однако, количество распадов в минуту (dpm), характеризующее активность метанобразования, оставалось значительным (8000 dpm). Полученные результаты показали, что суммарная скорость процесса метанобразования при температуре -10°C (средняя температура этих пород) сравнима со скоростью тех же процессов, наблюдаемых в осадочной толще Прикаспийской впадины, представляющей совсем иные экологические условия.

Исследования образцов ММО тундровой зоны северо-восточного сектора Арктики (Колымская низменность) с радиоактивно меченными изотопами показали наличие психрофильных метаногенных архей в эпикриогенных ММО (Rivkina and Kraev, 2008) и метанотрофных микроорганизмов как в эпикриогенных, так и в синкриогенных отложениях (Khmelenina *et al.*, 2002).

Имеющиеся данные по метаболической активности чистых и смешанных культур из вечной мерзлоты суммированы в таблице 4.

Все изложенные выше сведения прямо или косвенно указывают на возможность существования в вечной мерзлоте метаболически активных микробных сообществ, исследование которых имеет большое теоретическое и практическое значение и приблизит к пониманию таких глобальных биогеохимических процессов, как цикл углерода, серы и азота, которые все еще остаются неучтенными (Rivkina *et al.*, 2004).

Таблица 4. Микробная активность чистых культур и сообществ вечной мерзлоты при отрицательных температурах.

Активность	Микроорганизмы	T, °C	Источник выделения	Ссылка
Рост	<i>Psychrobacter</i> sp. 5	-10	Криопэги Арктики	Bakermans <i>et al.</i> , 2003
Выделение CO ₂ (дыхательная активность)	<i>Pseudomonas</i> sp. 3-2005	-17	Вечномерзлые грунты, Аляска	Panikov and Sizova, 2007
	<i>Arthrobacter</i> sp. 9-2	-17		
	<i>Polaromonas</i> sp.	-1		
Восстановление резазурина (дыхательная активность)	Изоляты с неустановленным таксономическим статусом	-10	Криопэги Арктики	Bakermans <i>et al.</i> , 2003
Включение ¹⁴ C-ацетата в липиды	Смешанные популяции	-10	Вечномерзлые грунты, Арктика	Rivkina <i>et al.</i> , 2000
Включение ¹⁴ C-глюкозы в биомассу	Смешанные популяции	-15	Криопэги Арктики	Gilichisky <i>et al.</i> , 2003
Метаногенез	Смешанные популяции	-16.5	Криопэги Арктики	Ривкина <i>и др.</i> , 2002
Окисление метана	Смешанные популяции	-5	Вечномерзлые грунты, Сибирь	Khmelenina <i>et al.</i> , 2002
Окисление ¹⁴ C-глюкозы	Смешанные популяции	-40	Вечномерзлые грунты, Аляска	Panikov <i>et al.</i> , 2006
Выделение CO ₂	Смешанные популяции	0 ... -40	Вечномерзлые грунты, Аляска	Panikov <i>et al.</i> , 2006
Метаногенез	Смешанные популяции	5, -1.8, -5, -10, -16.5,	Вечномерзлые грунты, северо-восток Арктики	Rivkina and Kraev, 2008

ГЛАВА 2. Домен *Archaea*: разнообразие и распространение

2.1. Происхождение и эволюция

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

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

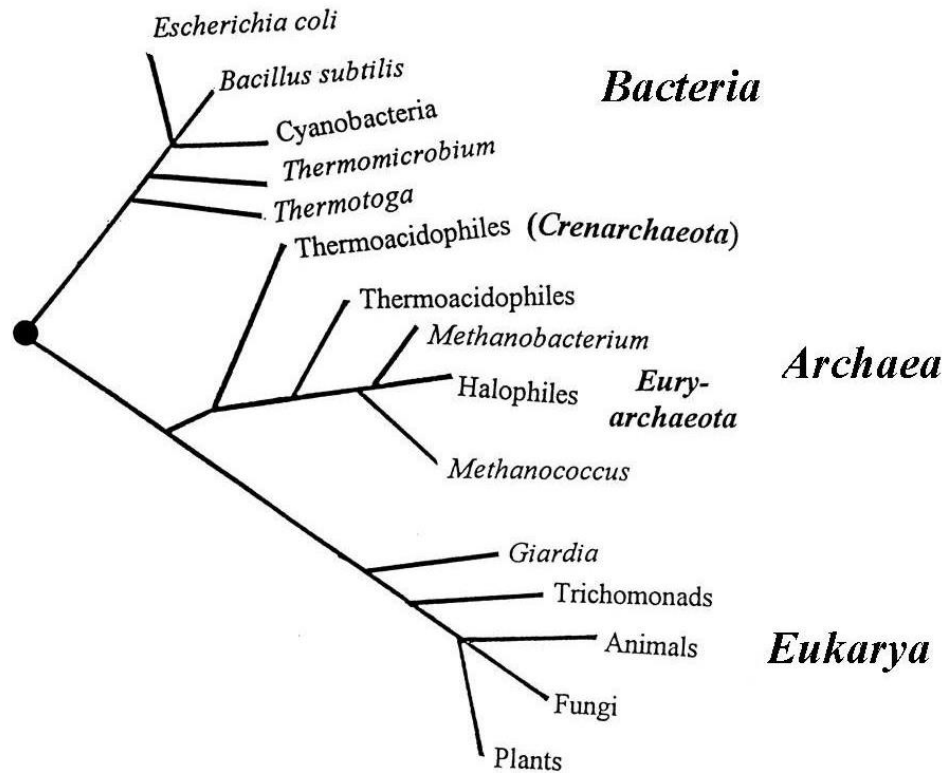


Рисунок 2. Универсальное древо жизни, показывающее положение трех доменов, основанное на сравнении последовательностей рРНК (Woese *et al.*, 1990).

Кроме того, важнейшим свойством, объединяющим прокариот и архей, является наличие одинаковых консервативных участков белков, таких как Hsp70 (Gupta *et al.*, 1998), глутамат синтетазы I (Brown *et al.*, 1994) и аспарагил тРНК синтетазы (Gupta, 1997). Что касается родства архей и эукариот, то данный вопрос остается неясным и является предметом научных споров и одной из самых обсуждаемых тем эволюционной биологии. Несмотря на то, что существует большое количество конкурирующих гипотез, считается, что геномы эукариот являются химерными, то есть эукариотические гены, связанные с обработкой информации, эволюционировали из гомологичных генов *Euryarchaeota* или *Crenarchaeota*, а гены, отвечающие за метаболические пути, имеют бактериальное происхождение (Yutin *et al.*, 2008; Spang *et al.*, 2013). Кроме того, есть данные, что между эукариотами и археями происходил горизонтальный перенос генов. Например, в геноме термофильной бактерии *Thermotoga maritima* обнаружено 24% генов, схожих с генами архей (Nelson *et al.*, 1999).

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

После первых публикаций, в которых археи рассматривались как возможные прямые потомки эволюционно древних микроорганизмов, они стали излюбленным объектом исследований в области эволюции, ультраструктуры, генетики, биохимии и биофизики. С учетом того, что археи хорошо растут преимущественно в экстремальных условиях, усилия исследователей были сосредоточены на выделении новых типов архей из таких экосистем, как горячие источники, глубоководные гидротермы и щелочные озера, что привело к описанию многочисленных микроорганизмов с ранее не изученными свойствами. В пользу самостоятельности Archaea как домена стало также открытие ряда уникальных эпигенетических свойств, а именно, первичная структура рРНК, АТФ-синтазы и фактора элонгации EF-TU; вторичная структура рРНК; клеточная стенка в виде наружной мембраны или S-слоя, состоящего из субъединиц белков или гликопротеинов; отсутствие в клеточной стенке D-аминокислоты, что, в свою очередь, обуславливает устойчивость к пенициллину; наличие ДНК-зависимой РНК-полимеразы, нечувствительной к антибиотикам; отличительная природа липидов; а также модификации тРНК («Современная микробиология», 2005).

Вскоре после того, как домен *Archaea* стали считать таксономически обособленным, возник вопрос о положении корня архейного древа жизни, что является необходимым для установления эволюционных отношений между филумами и выявления природы общего предка. До настоящего времени корень архейного домена размещали между филумами *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* (Woese *et al.*, 1990), однако недавние исследования изменили данную концепцию, поместив корень древа архей в пределах филума *Euryarchaeota*, что фактически разделило этот филум на два больших кластера: Кластер I, включающий

Proteoarchaeota/TACK, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* и *Thermococcales*, и Кластер II, содержащий всех остальных *Euryarchaeota* (Raymann *et al.*, 2015). Данная теория позволяет по-новому взглянуть на происхождение и эволюцию архей. Оба эти кластера включают метаногенные линии, что не исключает вероятности наличия у последнего общего архейного предка способности к метаногенезу, которая могла быть неоднократно утрачена во время эволюции. (Raymann *et al.*, 2015). Большое количество недавно обнаруженных метаногенных линий, включая членов суперфилума TACK (Evans *et al.*, 2015; Vanwonterghem *et al.*, 2016), также поддерживают эту теорию (Borrel *et al.*, 2016). Однако, данные филогенетических исследований, помещающие метаногенов у основания архейного древа, оспаривают эти выводы. В зависимости от применяемого метода изучения филогении архей исследователи получают данные, показывающие, что самыми древними архейными линиями могут быть *Nanohaloarchaea*, *Nanoarchaeota*, ARMAN или *Thermococcales* (Guy *et al.*, 2011; Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Yutin *et al.*, 2012).

2.2 Классификация архей

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

разнообразии третьего домена жизни и включить новые филумы и суперфилумы (Rinke *et al.*, 2013; Kubo *et al.*, 2013) (Рисунок 3).

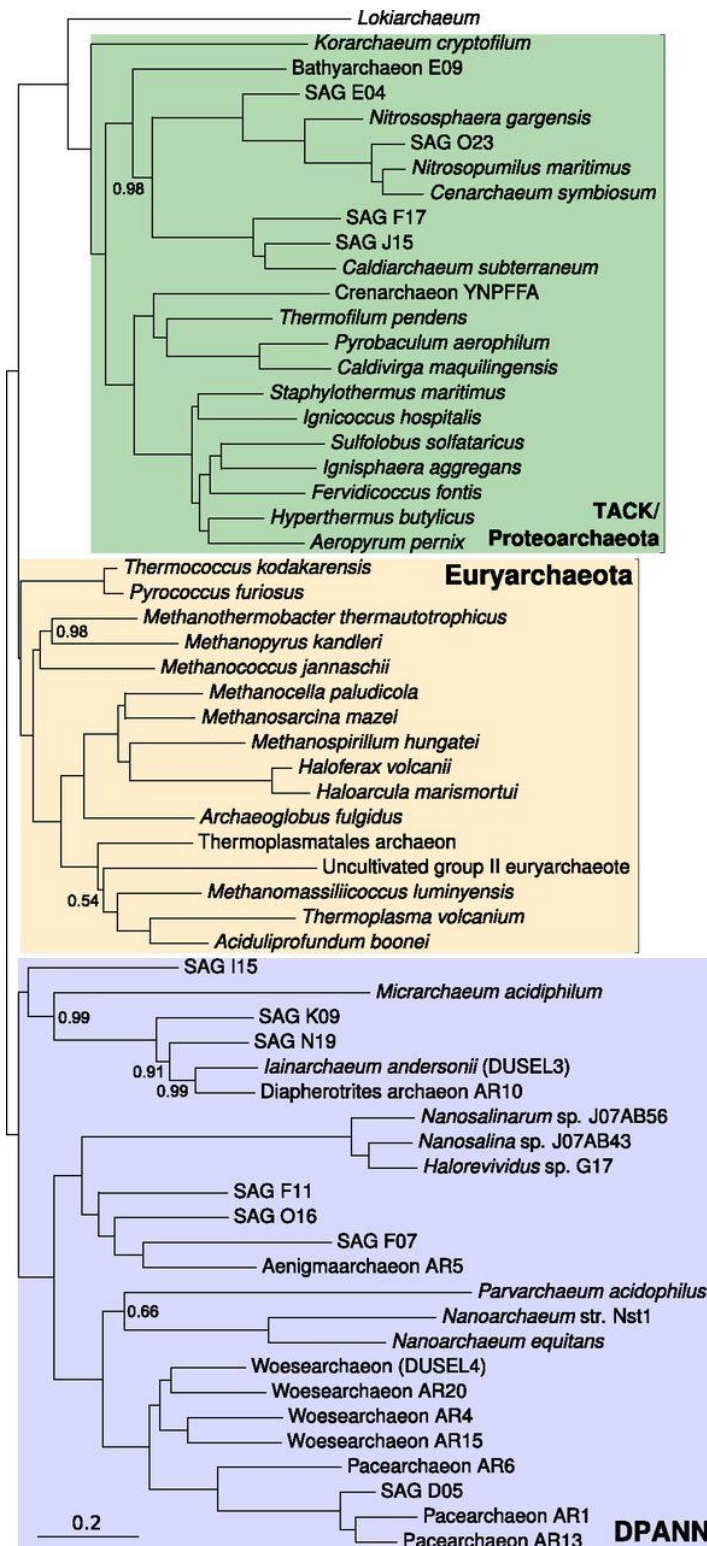


Рисунок 3. Корневое древо архей, построенное на основе статистических алгоритмов (Williams *et al.*, 2017).

Так, например, в результате анализа последовательностей гена 16S рРНК оказалось, что давно отделившимся от других архей и не принадлежащим к их основным группам является филум *Korarchaeota*. Анализ генома единственного на данный момент описанного некультивируемого вида *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* (Elkins *et al.*, 2008), полученного из образца горячего источника, указал на наличие схожих с *Cren*- и *Euryarchaeota* признаков, что подтверждает гипотезу о возможном существовании общего предка с данными группами.

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

Данные геномных исследований в значительной степени расширили представления о сестринском филуме *Thaumarchaeota* - *Aigarchaeota*, который

представляет собой ветвь архей, широко распространенных в умеренных или очень жарких земных, морских и подземных экосистемах (Hedlund *et al.*, 2015). Способность к аэробнозису ввиду наличия в геномах *Thaumarchaeota* и *Aigarchaeota* цитохромоксидазы ставит вопрос о том, предшествовало ли приобретение данного свойства расхождению этих филумов или развилось независимо. Первые опубликованные данные о геноме '*Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*' филума *Aigarchaeota* были получены в результате исследования подземных геотермальных вод. Транскриптомный анализ другого микроорганизма '*Ca. Caldithenuis aerorheumensis*', выделенного из микробного сообщества горячего источника, выявил метаболический потенциал *Aigarchaeota in situ* (Beam *et al.*, 2016). Представители данного филума были хемоорганогетеротрофами, разлагающими аминокислоты и жирные кислоты, пептиды и углеводы, и имели нитчатые структуры. У этих микроорганизмов отсутствовала способность синтезировать витамины и кофакторы, которые они, вероятно, получают от других членов сообщества (Beam *et al.*, 2016).

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

Другая линия, которая появилась как отдельная ветвь на архейном древе, включает некультивируемую группу кренархей (HWCG I), представители которой были обнаружены в гидротермальных источниках (Nunoura *et al.*, 2005, 2010). До

недавнего времени единственным микроорганизмом, чей геном был секвенирован, являлся *Ca. Caldiarchaeum subterraneum*, полученный из геотермального источника. Исследование данного генома показало наличие компонентов эукариотных убиквитин-подобных белковых систем, не обнаруженных у других архей и бактерий. Это уникальное свойство дало предположение, что *Ca. Caldiarchaeum subterraneum* и другие микроорганизмы данной группы могут представлять собой новый филум *Aigarchaeota*. В дополнение к HWCG I в состав этого филума было предложено ввести группу MCG (смешанная группа кренархей) (Guy and Ettema, 2011; Kubo *et al.*, 2012). Результаты филогенетического анализа конкатенированных последовательностей генов позволили отнести группу MCG в новую ветвь, занимающую положение между *Taum*- и *Aigarchaeota* (Lloyd *et al.*, 2013).

Bathyarchaeota – новая ветвь суперфилума TACK, близкая ветви *Taumarchaeota/Aigarchaeota*. Все эти линии сближает наличие топоизомеразы IB, характерной эукариотам (Meng *et al.*, 2014). Филум *Bathyarchaeota* включает 17 семейств, микроорганизмы которых представляют значительную часть наземных и морских экосистем (Kubo *et al.*, 2012; Lloyd *et al.*, 2013) и обладают разными типами метаболизма, а также широким спектром адаптаций. Для шести семейств в настоящее время имеются доступные геномные данные, анализ которых позволил установить, что их представители для получения углерода и энергии способны разлагать пептиды, а также углеводы, жирные кислоты или ароматические соединения (Lloyd *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016). Эксперименты с ^{13}C -меченными субстратами показали, что микроорганизмы данной группы могут использовать различные органические соединения для гетеротрофного роста. Кроме того некоторые члены филума обладают генами, отвечающими за образование ацетата из CO_2 и H_2 (He *et al.*, 2016; Lazar *et al.*, 2016). Отмечено также возможное участие в метановом цикле (Evans *et al.*, 2015). Такая метаболическая гибкость и способность к росту на широком спектре субстратов дает экологическое преимущество для

представителей филума *Bathyarchaeota* и подчеркивает важную роль данной группы в цикле углерода.

Еще одним из недавно предложенных архейных филумов является филум *Geoarchaeota*, включающий новую группу NAG-1, и возникший как начальная ветвь филума *Crenarchaeota*. Выделение данной линии в отдельный филум оказалось возможным в результате филогенетического анализа конкатенированных рибосомальных белков, генов 16S/23S рРНК, а также генов информационного процессинга (Kozubal *et al.*, 2013). Представители данной группы были обнаружены в кислом источнике Йеллоустонского национального парка (Kozubal *et al.*, 2012, 2013). Микроорганизмы группы NAG-1 выживают в условиях горячих (60-78°C) кислотных матов, богатых железом. Предполагается, что для гетеротрофного роста они используют простые углеродные соединения.

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

Существующая до недавнего времени центральная догма о метаногенезе как метаболическом цикле, присущем только филуму *Euryarchaeota*, в настоящее время подвергается сомнению благодаря обнаружению предполагаемых генов метаболизма метана у представителей других филумов. Это свидетельствует о том, что метаногенез может быть более филогенетически распространенным, нежели считается в настоящее время. Эванс и коллеги (Evans *et al.*, 2015) провели метагеномное исследование угольного месторождения Сурат бассейна (Австралия), в результате которого получили два почти полных генома (Ba1 и Ba2), относящихся к филуму *Bathyarchaeota*. Результаты метаболической реконструкции генома Ba1 указали на наличие большого числа генов пути Вуда - Льюнгдаля и генов, участвующих в метаболизме метана, среди которых были гены, кодирующие метил – коэнзим М редуктазный комплекс - *mcrABG* и *mcrCD* и отвечающие за метаногенез из метилсульфидов – *mtsA*, метанола – *mtbA*, метиламинов - *mtaA*, *mttBC*, *mtbBC*, а также три субъединицы *mtrH*. Наличие таких генов свидетельствует о способности использовать различные метильные соединения, что свойственно облигатным H_2 -использующим метилотрофным метаногенам порядка *Methanomassiliicoccales*. Кроме того в геноме были идентифицированы двенадцать новых метилтрансфераз, сходных между собой, но отличающихся от уже известных, что говорит о том, что микроорганизмы могут использовать для метаболизма дополнительные метилированные соединения. Поиск гомологичных и консервативных последовательностей гена *mcrA* доступных метагеномов, полученных из метаногенных экосистем, а именно нефтеносных песчаников Канады, нефтегазоносного бассейна Северного моря и некоторых водных экосистем, указал на большое сходство с фрагментами гена *mcrA*, нехарактерного как для филума *Euryarchaeota*, так и для филума *Bathyarchaeota* (Evans *et al.*, 2015). Данные результаты дают основания полагать, что *mcrA* ген эволюционировал как функциональная единица, а метаболизм метана был свойственен общему предку *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota*.

В 2016 были опубликованы данные исследований (Vanwonterghem *et al.*, 2016), расширяющие представления о метаногенном разнообразии архей. В

результате культивирования образцов из природных и искусственных экосистем, в ходе которого наблюдалось стабильное образование метана, были получены шесть почти полных метагеномов, содержащих четыре гена *mcrA*. Гомологичные последовательности трех исследованных геномов были на 94-99% идентичны таковым метаногенных линий филума Euryarchaeota, в то время как ген *mcrA* четвертого генома оказался дивергентным. В результате метагеномного анализа образцов анаэробного биореактора (Малайзия), нефтеносных песчаников (Канада) и угольных скважин Австралии были обнаружены идентичные последовательности дивергентного гена *mcrA*. Филогенетический анализ гена 16S рРНК показал, что данные последовательности образуют кластер с клонами смешанной группы кренархей (ТМCG), а сравнительный анализ геномов показал $41 \pm 1,5\%$ сходства по аминокислотным остаткам с другими представителями *Archaea*, что указывает на таксономическую обособленность нового филума, для которого было предложено название *Verstraetearchaeota*.

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

Разработка методов, не зависящих от культивирования, обеспечила доступ к геномным данным большого количество архейных линий, которые были недоступны до этого времени, что, в свою очередь, позволило по-новому взглянуть на разнообразие и метаболический потенциал архей из различных мест обитания. Архейное древо быстро заполняется новыми филумами, тем самым

предоставляя информацию о происхождении и эволюции этого домена, и представляет собой огромное разнообразие, которое еще предстоит исследовать.

2.3. Методы изучения архейного разнообразия

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

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

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

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

Также для определения разнообразия архей в многолетнемерзлых отложениях используется метод ДГГЭ/ТГГЭ денатурирующий/температурный градиентный гель-электрофорез (Yu *et al.*, 2008).

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

Для визуализации клеток архей применяют метод флуоресцентно меченых РНК-зондов (FISH) (Amann *et al.*, 1995). С помощью данного метода микроорганизмы не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным таксонам. Для повышения точности и чувствительности метода вплоть до количественной оценки активности единичной клетки вместо стандартной флуоресцентной гибридизации используется технология CARD-FISH - катализируемое осаждение метки с флуоресцентной гибридизацией *in situ*. Метод CARD-FISH основан на применении меченых молекул тирамина (Wilhartitz *et al.*, 2005).

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

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

2.4. Некультивируемое разнообразие архей в вечной мерзлоте

Как отмечалось ранее, что общее количество клеток, обнаруженных в Арктических многолетнемерзлых отложениях, составляет 10^3 - 10^8 кл/г (Rivkina *et al.*, 1998). Однако получить сведения о составе микробного сообщества с помощью классических биологических методов крайне тяжело. Поэтому исследования разнообразия микроорганизмов в такого рода экосистемах проводят с помощью культурально-независимых методов (Zhou *et al.*, 1997; Нøj *et al.*, 2005; Neufeld and Mohn, 2005; Ganzert *et al.*, 2007; Steven *et al.*, 2007; Rivkina *et al.*, 2016).

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

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

Ривкиной с соавторами (Rivkina *et al.*, 2016) были проведены метагеномные исследования двух образцов ММО Арктики (Колымская низменность): образца ледового комплекса (глубина 16 м) и образца позднеплейстоценовых многолетнемерзлых отложений (глубина 23 м). Образцы были приблизительно одного возраста, но различались содержанием метана, который был обнаружен только во втором образце. Полученные результаты показали, что археи были обнаружены и в том, и в другом образцах. Но метаногенные археи были приурочены к образцу, содержащему метан, и являлись представителями родов *Methanosarcina* (0.14% от общего числа секвенированных последовательностей),

Methanoregula (0.03%), *Methanoculleus* (0.05%), *Methanosphaerula* (0.03%), *Methanospirillum* (0.03%), и *Methanosaeta* (0.03%).

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

В результате исследования состава архейного сообщества многолетнемерзлых отложений Цинхай-Тибетского плато (Wei *et al.*, 2014) были получены библиотеки клонов гена 16S рРНК, филогенетический анализ которых показал, что 47.2% последовательностей относились к филуму *Crenarchaeota* и 52.8% - к *Euryarchaeota*. Реконструированные последовательности *Crenarchaeota* объединились в одну филогенетическую группу 1.3b/MCG-A (Ochsenreiter *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2014). В то же время последовательности *Euryarchaeota* разбились на филогенетические группы *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae* и неклассифицированную группу *Euryarchaeota* с процентным содержанием архейных клонов 0.3, 1.1, 1.4, and 50.0 %, соответственно.

В этом исследовании также было показано относительное распределение различных филогенетических групп в зависимости от глубины. Так, и в активном слое, и в многолетней мерзлоте доминантными были филумы *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*, однако в процентном соотношении в активном слое преобладал филум *Crenarchaeota* (51.2% *Crenarchaeota* и 48.8% *Euryarchaeota*), а в более глубоких слоях многолетнемерзлых отложений – филум *Euryarchaeota* (58.8% *Euryarchaeota* и 41.2% *Crenarchaeota*)(Wei *et al.*, 2014).

Глава 3. Метанобразующие археи

В связи с глобальными изменениями климата за последние несколько десятилетий внимание исследователей сосредоточилось на выбросе метана из высокоширотных экосистем. Как известно, биогенный метан образуется в ряде биохимических реакций, выполняемых группой строго анаэробных метаногенных архей (Ferry, 1993, 2001; Zinder, 1993). Их естественной средой обитания в арктических регионах является тундра, богатая органическим веществом. Арктические тундровые грунты в Сибири находятся в постоянно замерзшем состоянии, исключение составляет активный слой с сезонными циклами замораживания-оттаивания в диапазоне температур от -57°C до 25°C (Wagner *et al.*, 2005). Образование метана, сопровождаемое выбросом с поверхности, наблюдается в современных тундровых почвах (Whalen and Reeburgh, 1990; Kotsyurbenko *et al.*, 1996, 2004; Wagner *et al.*, 2003) и донных отложениях болотных озер (Zimov *et al.*, 1997; Nozhevnikova *et al.*, 2001, 2003; Walter *et al.*, 2006). Согласно исследованиям, значительное количества метана было выведено из биогеохимического цикла и сохраняется ниже сезонного-талого слоя (Rivkina *et al.*, 1992; Gilichinsky *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1998) глубиной в несколько сотен метров, следовательно, такие месторождения метана в вечной мерзлоте являются огромным потенциальным источником древнего CH_4 . Кроме того, как показывают исследования, кроме метана в многолетнемерзлых отложениях также сохранились анаэробные микроорганизмы, в том числе метаногенные археи (Rivkina *et al.*, 1998).

3.1. Общая характеристика и распространение

Метаногенные археи - это специализированная группа микроорганизмов, выполняющая важную экологическую и метаболическую функции в природных экосистемах. Они участвуют в анаэробном разложении органического вещества и отвечают за образование метана в различных местах обитания.

Метаногены населяют различные природные и антропогенные экосистемы с широким диапазоном физико-химических условий: морские (Kendall *et al.*, 2006)

и пресноводные осадки (Borrel *et al.*, 2012), нефтяные залежи (Jeanthon *et al.*, 2005), рисовые поля (Kitamura *et al.*, 2011), озера (Zhu *et al.*, 2011), торфяные болота (Bräuer *et al.*, 2006), биореакторы (Yashiro *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2015) и пищеварительный тракт животных (Lin *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2016).

Метаногенные археи приспособились к экстремальным условиям существования при кислых и щелочных значениях pH (Worakit *et al.*, 1986), высоких концентрациях солей (Sorokin *et al.*, 2015; Zhilina *et al.*, 2013), кислот (Savant *et al.*, 2002), а также обнаружены в гидротермальных вентх (Stewart *et al.*, 2015) и наземных горячих источниках (Ding *et al.*, 2010). Благодаря культурально-независимым методам стало возможным идентифицировать метаногенных архей в многолетнемерзлых отложениях плиоценового и плейстоценового возраста (Rivkina *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2013).

В состав группы входят археи с разной морфологией: прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной формы, близкие к коккам; извитые формы. У некоторых видов наблюдается тенденция формировать нити или пакеты. Клетки неподвижные или передвигающиеся с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. У представителей рода *Methanosarcina* в клетках найдены газовые вакуоли. Для некоторых метаногенов характерна развитая система внутриклеточных элементарных мембран, являющихся результатом разрастания и впячивания в цитоплазму ЦПМ и сохраняющих с ней связь. У этой группы архей обнаружены клеточные стенки трех типов: состоящие из псевдомуреина, построенные из белковых глобул и гетерополисахаридной природы. Описан микоплазмоподобный метаноген, выделенный в род *Methanoplasma*, не имеющий клеточной стенки и фильтрующийся через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

20 - 30% мембранных липидов метаногенов представлены нейтральными и 70-80% – полярными липидами. Последние – это в основном два типа простых эфиров глицерина и терпеноидных спиртов (C₂₀-фитаниловый и C₄₀-бифитаниловый), на основе которых образуются полярные фосфо- и гликолипиды. В зависимости от вида клеточные мембраны могут содержать оба

типа эфиров или только один. Основными нейтральными липидами являются C_{20} -, C_{25} - и C_{30} -ациклические изопреноидные углеводороды, насыщенные или содержащие двойные связи. Запасные вещества в виде поли- β -оксимасляной кислоты или гликогена в клетках не обнаружены. Метанобразующие археи – строгие анаэробы, рост их возможен при начальном окислительно-восстановительном потенциале среды ниже – 300 мВ. Рост практически всех видов полностью подавляется при содержании в газовой фазе более 0,004% молекулярного кислорода.

Однако, описаны виды с относительно низкой чувствительностью к O_2 . В их клетках обнаружена супероксиддисмутаза. Возможно, в природе такие виды могут сохранять жизнеспособность при кратковременных контактах с воздухом и возобновлять рост в анаэробных условиях.

Большинство метанобразующих архей имеют температурный оптимум роста в области 30-40°C, т.е. являются мезофилами, но есть виды, у которых оптимальная зона сдвинута в сторону более низких или высоких температур. Так, выделены экстремально термофильные организмы родов *Methanothermus* и *Methanocaldococcus*, растущие при температурах 55-97°C. Облигатные психрофилы представлены среди метаногенов единственным видом *Methanogenium frigidum* (Franzmann *et al.*, 1997). Однако, известен ряд психроактивных метанобразующих архей с температурным оптимумом роста от 15 до 28 °C, относящихся к родам *Methanococcus*, *Methanogenium*, *Methanococcoides*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* и *Methanospirillum* (Franzmann *et al.*, 1992; Simankova *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2002; von Klein *et al.*, 2002; Singh, 2005; Kendall *et al.*, 2007; Krivushin *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2013; Parshina *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014) и выделенные как из природных, так и антропогенных мест обитания.

Большая часть метаногенов – нейтрофилы с оптимальным pH в области 6,5-7,5. Среди метаногенов есть галофилы (роды *Methanosalsum*, *Methanocalculus*) , требующие в качестве одного из оптимальных условий для роста содержания в среде до 65-70 г/л NaCl.

Метаногены используют узкий круг соединений в качестве источника углерода и энергии, в числе которых наиболее универсальной является газовая смесь H_2 и CO_2 (более $\frac{3}{4}$ видов). Некоторые метаногены, например, представители родов *Methanobacterium* и *Methanococcus*, являются облигатными автотрофами. Следующими по распространенности источниками углерода и энергии служат формiat, ацетат, метанол, метиламины и моноокись углерода. Около половины изученных видов не нуждаются в каких-либо органических соединениях. Для роста многих культур в атмосфере H_2 и CO_2 требуется внесение в среду органических веществ, стимулирующих рост или абсолютно для него необходимых. Это могут быть некоторые витамины группы В, ацетат, пируват, сукцинат, отдельные аминокислоты, дрожжевой экстракт или компоненты неизвестного состава, содержащиеся в природных средах обитания. Сложные органические соединения метанобразующие археи использовать не могут. В качестве источника азота метаногены используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Для ряда видов показана способность к азотфиксации. Источником серы могут служить сульфаты, сульфид или серосодержащие аминокислоты.

Порядок *Methanosarcinales* представлен ацетотрофными и/или метилотрофными организмами, обитающими в пресноводных и морских осадках, бескислородных почвах, отходах животноводства, анаэробных биореакторах. Эти метаногены способны использовать наиболее широкий спектр субстратов. Они образуют метан не только из C_1 - и C_2 -соединений, но и из нитроароматических соединений, тетрахлорэтилена, хлороформа и трихлорфторметана. Процесс превращения ацетата и метанола в метан известны у представителей родов *Methanosarcina* и *Methanothrix*. Полная схема их утилизации представлена на Рисунке 4.

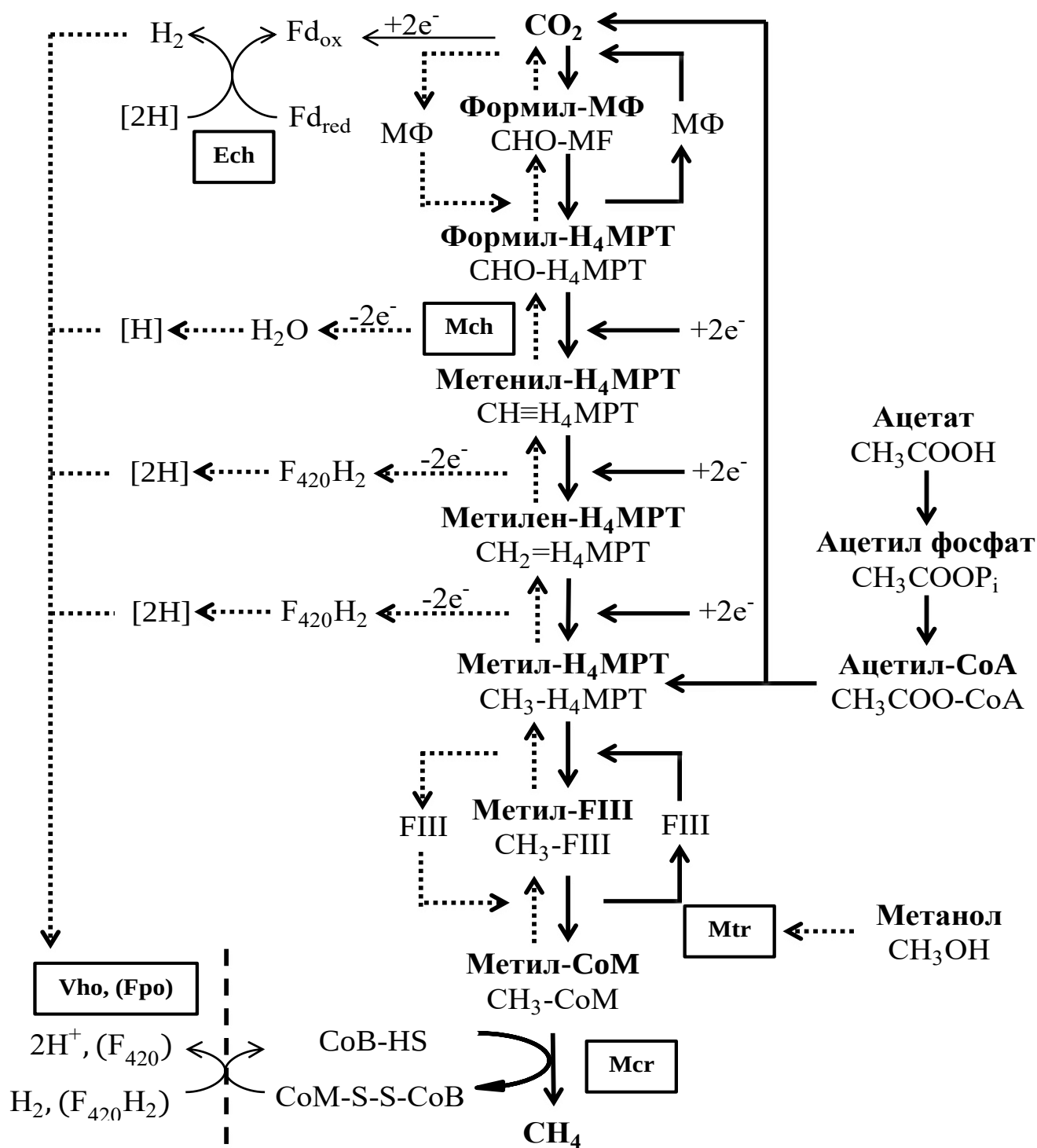


Рисунок 4. Общая схема ацетокластического и метилотрофного путей метаногенеза (Welander and Metcalf, 2005)

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

3.2. Современные представления о филогении метаногенов

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

Все известные метаногенные археи относятся к филуму *Euryarchaeota* и представляют классы: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia*, *Methanopyri* и *Thermoplasmata* (<http://www.bacterio.net/methanobacterium.html>). В пределах классов было описано пять порядков: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, и *Methanopyrales* (Boone, 1993).

Порядок *Methanobacteriales* включает неподвижные метаногены с клеточной стенкой из псевдомуреина и сложных эфиров C_{20} и C_{40} в составе мембран. Данный порядок включает 2 семейства (*Methanobacteriaceae* и *Methanothermaceae*), объединяющих 5 родов (*Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanothermus*).

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

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

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

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

В настоящее время к имеющимся порядкам присоединились порядки *Methanocellales*, включающий семейство *Methanocellaceae* и род *Methanocella* (Sakai *et al.*, 2008), *Methanomassiliicoccales*, включающий семейство *Methanomassiliicoccaceae* и род *Methanomassiliicoccus* (Iino *et al.*, 2013). Всего в настоящее время выделяют 36 родов метанобразующих архей, образующих 15 семейств (Рисунок 5).

Domain "Archaea"

Phylum "Euryarchaeota"

Class "Methanomicrobia"

Order Methanocellales

Family Methanocellaceae

Methanocella

Order Methanomicrobiales

Family Methanocorpusculaceae

Methanocorpusculum

Family Methanomicrobiaceae

Methanoculleus

Methanofollis

Methanogenium

Methanolacinia

Methanomicrobium

Methanoplanus

Family Methanoregulaceae

Methanolinea

Methanoregula

Methanosphaerula

Family Methanospirillaceae

Methanospirillum

Family unassigned

Methanocalculus

Order Methanosarcinales

Family Methanosaetaceae

Methanosaeta

Methanothrix

Family Methanosarcinaceae

Halomethanococcus

Methanimicrococcus

Methanococcoides

Methanohalobium

Methanohalophilus

Methanolobus

Methanomethylovorans

Methanosalsum

Methanosarcina

Family Methermicoccaceae

Methermicoccus

Order Methanomassilicoccales

Family Methanomassilicoccaceae

Methanomassiliicoccus

Class Methanobacteria

Order Methanobacteriales

Family Methanobacteriaceae

Methanobacterium

Methanobrevibacter

Methanosphaera

Methanothermobacter

Family Methanothermaceae

Methanothermus

Class Methanococci or Methanothermea

Order Methanococcales

Family Methanocaldococcaceae

Methanocaldococcus

Methanotorris

Family Methanococcaceae

Methanococcus

Methanothermococcus

Class Methanopyri

Order Methanopyrales

Family Methanopyraceae

Methanopyrus

Рисунок 5. Схема, отражающая состав архейного филума *Euryarchaeota* (<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html#archaea>)

3.3. Метаболическая кооперация метаногенов с другими микроорганизмами

Анаэробная деградация органических веществ до метана и углекислого газа является широко распространенным и многоступенчатым процессом в анаэробных экотопах, где имеется ограниченный запас нитратов, сульфатов и окисленных форм железа и марганца. Участвуя в последней стадии минерализации органического вещества, метаногены, ввиду низкой энергетической выгоды данного процесса, способны ассимилировать всего 5-10% поступающего углерода (Калужный, 1991), в связи с чем, они вынуждены вступать в синтрофные взаимодействия с другими микроорганизмами (McInerney *et al.*, 1979).

Классическим примером синтрофных взаимодействий, типичных для метаногенов, является культура «*Methanobacterium omelianskii*» (Barker *et al.*, 1940), которая позже была описана как бинарная культура двух штаммов, превращающих этанол в ацетат и метан путем межвидового переноса водорода (Bryant *et al.*, 1967) между метаногеном *Methanobacterium bryantii* М.о.Н.^Т и организмом S. В виду такого тесного взаимодействия микроорганизмов друг с другом, представляется трудным их культивирование, и получать чистые культуры из таких ассоциаций удалось относительно недавно.

В настоящее время существует несколько смыслов, которые вкладывают в термин «синтрофия»:

- кооперация, в которой оба партнера зависят друг от друга для поддержки метаболической активности и которая не может быть заменена простым добавлением косубстрата или какой бы то ни было пищевой добавки (Schink, 1997);
- тесные парные мутуалистические взаимодействия, дающие существенную пользу для функционирования глобального цикла углерода в анаэробных условиях (McInerney, 2011);
- термодинамически взаимозависимый стиль жизни, когда деградация соединения, например органической кислоты, осуществляется только тогда, когда

концентрация конечных продуктов поддерживается на низком уровне (McInerney, 2011);

- пищевая ситуация, когда два или более организмов объединяют свои метаболические возможности для катаболизма субстрата, который не может катаболизироваться ни одним из организмов индивидуально (Stams and Plugge, 2009);

- отношения, в которых оба партнера зависят друг от друга по энергетическим соображениям и осуществляют процесс, который не могут совершить индивидуально (Schink, 2002).

Во всех описанных ситуациях могут принимать участие метаногены, и разнообразие синтрофных взаимодействий хорошо представлено в недавно опубликованном обзоре (Morris *et al.*, 2013). Существует также несколько примеров нетипичных синтрофных взаимодействий.

Анаэробная деградация гексоз в ацетат, CO₂, и H₂ является экзогенным процессом. Однако эта реакция не дает достаточной энергии для поддержки роста, если только давление водорода не будет снижаться (Thauer *et al.*, 1977; Schink, 1997). В безсульфатных аноксигенных средах развиваются сложные микробные сообщества, в которых метаногены и гомоацетогены способны поддерживать парциальное давление водорода на уровне 10⁻⁴ – 10⁻⁵ атм, что дает больше энергии на моль сброженной гексозы (Schink & Stams, 2006; Mueller *et al.*, 2008). Это способствует образованию ацетата, CO₂ и H₂ (или формиата). Эти конечные продукты легко конвертируются в CH₄ или ацетат метаногенными или гомоацетогенными партнерами, соответственно.

Новые бактерии из глубоких озерных отложений, ферментирующие гексозы, не были способны перейти на альтернативный пути ферментации, а зависели от метаногенного партнера для содействия в сбрасывании гексоз (Mueller *et al.*, 2008). Выделение этих бактерий было достигнуто только в совместной культуре с *M. hungatei*. Рост выделенного штамма *Bacillus* sp. был медленным и тормозился высокой концентрацией субстрата, что указывало на адаптацию к олиготрофным средам. Авторы предположили, этот уникальный тип

синтрофии может доминировать в природных экосистемах, характеризующихся низким содержанием органического вещества.

Совместное культивирование гипертермофильных архей (*Pyrococcus furiosus* и *Methanopyrus kandleri*) показало, что археи демонстрировали лучший рост, когда росли в паре (Schopf *et al.*, 2008). Проверка других метаногенных партнеров, показала, что они по разному влияют на рост *P. furiosus*, а лучший результат по выходу клеточной биомассы был достигнут с *Methanocaldococcus villosus*. Авторы постулировали (Weiner *et al.*, 2012), что это улучшение достигалось за счет межвидового переноса водорода, хотя, возможно, существуют и другие пока неизвестные механизмы взаимодействия на клеточном уровне.

3.4. Метаногенные археи из постоянно холодных экосистем

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

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

В качестве аргумента в пользу биогенного происхождения метана в вечной мерзлоте и способности метанобразующих архей выживать в течение длительного по геологическим меркам периода времени является тот факт, что из многолетнемерзлых отложений Арктики различного возраста в результате длительного культивирования были выделены чистые культуры метаногенных архей. Штаммы МК4^T и М2^T, относящиеся к роду *Methanobacterium*, были выделены из плейстоценовых и голоценовых отложений Колымской низменности с

глубины 28 и 2 м, соответственно. Оба являются мезофильными нейтрофильными автотрофами и относятся к водородпотребляющим метаногенам, однако штамм M2^T отличается от штамма МК4^T тем, что способен использовать формиат в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно филогенетическому анализу, ближайшим родственником для обоих штаммов является *Methanobacterium bryantii* М.о.Н.^T (Boone *et al.*, 1987). Эти два штамма, выделенные из ММО, были описаны как новые виды рода *Methanobacterium*: *M.veterum* МК4^T (Krivushin *et al.*, 2010) и *M.arcticum* M2^T (Shcherbakova *et al.*, 2011).

Таблица 5. Метаногены холодных экосистем

Метаноген	Расположение места выделения	<i>In situ</i> T (°C)	T _{опт} , °C	T _{max} , °C	T _{min} , °C
<i>Methanogenium frigidum</i>	Озеро Эйс, Антарктида	1-2	15	18	0
<i>Methanogenium marinum</i>	Skan Bay, Аляска	1-4	25	25	5
<i>Methanococcoides burtonii</i>	Озеро Эйс, Антарктида	1-2	23	28	-2
<i>Methanococcoides alaskense</i>	Skan Bay, Alaska	1-6	24-26	28	5
<i>Methanosarcina lacustris</i>	Озеро Соппен, Швейцария	5	25	35	1
<i>Methanosarcina baltica</i>	Skan Bay, Alaska	1-6	21	28	5
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	Мерзлые почвы	+15 - - 25	28	45	5
<i>Methanobacterium arcticum</i>	Голоценовые ММО	-10	37	42	10
<i>Methanobacterium veterum</i>	Плейстоценовые ММО	-10	28	46	10
' <i>Methanlobus psychrophilus</i> '	Цинхай-Тибетское плато	4	18		

Штамм SMA-21^T принадлежащий новому виду *Methanosarcina solidgelidi*, был выделен из многолетнемерзлых отложений острова Самойловский. Также является мезофильным нейтрофильным хемоавтотрофом, но в качестве источников для метанообразования использует H₂+CO₂, метанол и ацетат. Согласно филогенетическому анализу, ближайшим родственником для штамма SMA-21^T является *Methanosarcina mazei* S-6^T VKM B-1636^T (Mah and Kuhn, 1984).

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

3.5. Метаногенные археи - модельные объекты для астробиологических исследований

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

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

Первыми, кто выдвинули идею использования модели земной мерзлоты для решения проблем экзобиологии, были Кэмерон и Морелли (Cameron and Morelli, 1974). В настоящее время известно, что верхние 20-50 см поверхности Марса представляют собой слой рыхлого сухого мерзлого грунта, а последующий метр определяется как вечная мерзлота (Rummel *et al.*, 2014). Результаты исследований, полученные с орбитального аппарата «Марс Одиссей», показали, что на этой

планете есть обширные залежи льда (Boynton *et al.*, 2002; Demidov *et al.*, 2008; Cull *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014), что представляет перспективу для определения внеземной жизни, в частности психрофильной.

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

Метаногенные археи рассматривались в качестве модельных организмов для возможных форм жизни еще до того, как метан был обнаружен в атмосфере Марса (Boston *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 2000). Метаногены это анаэробные автотрофные микроорганизмы, использующие CO_2 и H_2 для продукции метана, отдельные штаммы могут выдерживать низкое давление и высушивание (Kral *et al.*, 2011), а также низкие температуры (Reid *et al.*, 2006), а именно такие условия характерны для Марса. Кроме того, был проведен ряд исследований, направленный на проверку выживаемости метаногенных архей в моделируемых условиях Марса (Kendrick and Kral, 2006; Altheide and Kral, 2008), и результаты показали, что метаногены способны приспосабливаться и привлекать для метаболизма дополнительные источники энергии (Chastain and Kral, 2010).

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

Заключение по обзору литературы

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

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

В связи с ростом интереса к астробиологии, интенсивность исследований в микробной экологии и разнообразия постоянно мерзлых отложений, таких как древняя вечная мерзлоты и лед, значительно возросла в последние годы. Психроактивные автотрофные метанобразующие археи, населяющие полярные области, рассматриваются как прототип для возможной жизни на криогенных планетах Солнечной системы.

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

Поскольку большая часть нашей планеты (80-90% по разным оценкам) находится круглогодично при температурах не выше 5°C, то процессы,

происходящие в холодных экосистемах, опосредуются адаптированными к холоду микроорганизмами. Для предсказания направлений тех или иных процессов приобретает большое значение знание физиологии осуществляющих их микроорганизмов. Несмотря на важность проблемы, имеются лишь отрывочные сведения, касающиеся распространения метаногенных архей в постоянно холодных местах обитания и их биологических свойствах. Частично это можно объяснить медленными скоростями роста этих микроорганизмов.

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 4. Материалы и методы исследования

4.1. Район исследования и отбор проб

Исследование проводилось в северо-западном секторе арктической тундры $68^{\circ}37'N$, $161^{\circ}21'54'E$ (устье реки Колымы), расположенном за пределами нефтегазовых площадей.

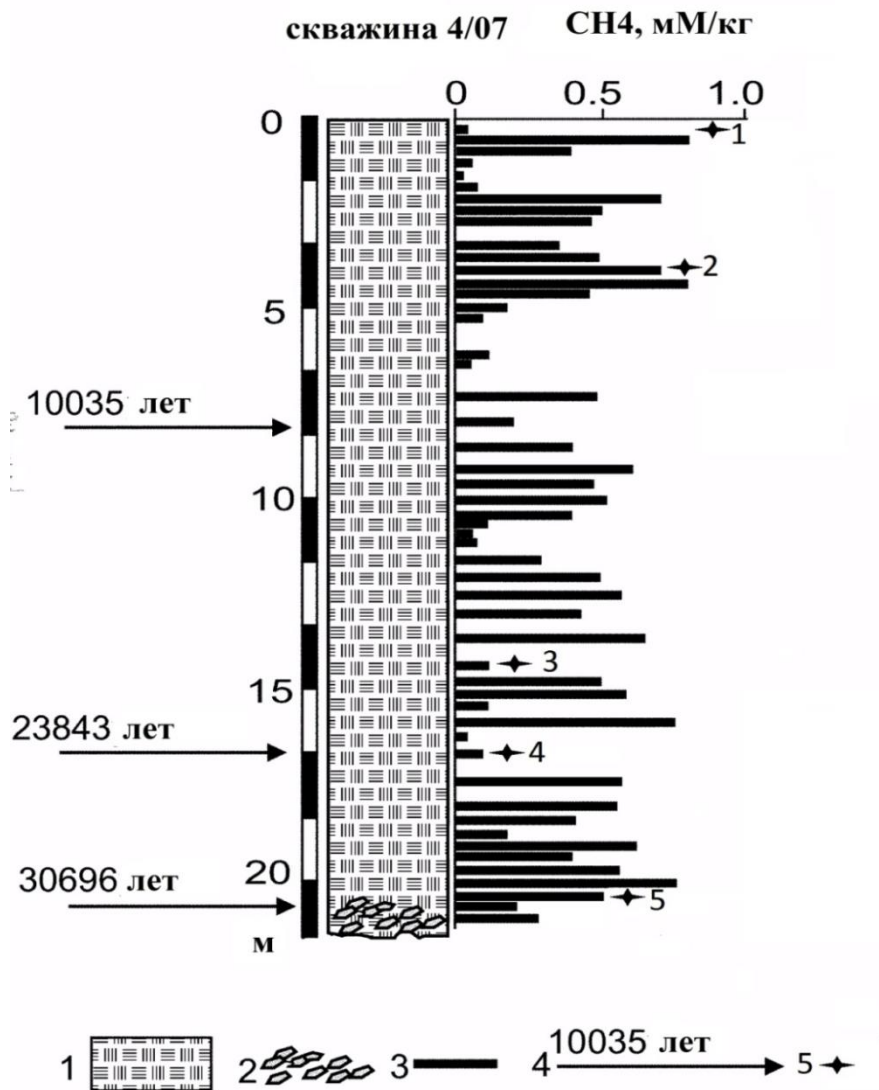


Рисунок 6. Характеристика многолетнемерзлых отложений

1 – супесчаные; 2 – песок с гравием; 3 – метан; 4 – радиоуглеродное датирование;
5 – исследуемые образцы

Изучаемая территория является прибрежной низменностью, для которой характерны мягкое лето (средняя температура июля составляет 10°C) и очень холодная зима (температура падает ниже -40°C), а среднегодовая температура варьирует от -11 до -13 °C (Shcherbakova *et al.*, 2016). Образцы были отобраны в ходе экспедиции в 2007 году из скважины 04-07 глубиной 23 метра. Колонковое бурение и отбор проб осуществлялись согласно ранее отработанной методике (Shi *et al.*, 1997). Каждый образец состоял из 5-6 частей весом от 1.5-2.0 г, взятых с разных участков керна. До начала анализов все образцы хранились в замороженном состоянии. Концентрация CH₄ была измерена хроматографически после выравнивания газовой фазы (Rivkina *et al.*, 2007). Общий органический углерод был определен как описано ранее (Shmelev *et al.*, 2013). На рисунке 6 отмечены места отбора проб для выделения общей ДНК и точно определенный возраст мерзлых пород.

4.2. Объекты исследования

Объектом исследований служила бинарная метаногенная культура JL01, состоящая из штамма метаносарцины и анаэробной, устойчивой к антибиотикам бактерии.

Для сравнительных экспериментов и определения белковых профилей целых клеток использовали штаммы метаногенных архей из Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM): *Methanobacterium veterum* MK4^T VKM B-2440^T, *Methanobacterium arcticum* M2^T VKM B-2372^T, *Methanobacterium bryantii* M.o.H^T VKM B-1629^T, *Methanosarcina masei* S6^T VKM B-1636^T, *Methanobacterium thermaggregans* VKM B-1959^T, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH^T VKM B-1908, *Methanobacterium thermoautotrophicus* VKM B-1852, *Methanobacterium arcticum* M2^T VKM B-2371, *Methanobacterium* sp. Z-245, *Methanobacterium* sp. VKM B-1960, *Methanobacterium* sp. VKM B-1852, *Methanobacterium* sp. VKM B-1631, *Methanobacterium* sp. VKM B-1633, *Methanobacterium* sp. VKM B-1632, *Methanobacterium* sp. VKM B-1630, *Methanobacterium ivanovii* VKM B-1634^T, *Methanobacterium formicicum* VKM B-2198, *Methanobacterium wolfei* VKM B-

1829^T, *Methanothermobacter* sp. VKM B-1958, *Methanothermobacter thermophilus* M^T VKM B-1786, *Methanothermobacter defluvii* ADZ^T VKM B-1962, *Methanothermobacter* sp. TF-1, *Methanosarcina* sp. VKM B-2278, *Methanosarcina* sp. VKM B-2824, *Methanosarcina* sp. VKM B-2256, *Methanosarcina* sp. VKM B-2199, *Methanosarcina* sp. VKM B-2827, *Methanosarcina* sp. Pr-I, *Methanosarcina* sp. Pr-II^T, *Methanosarcinagilichinskia* JL01 VKM B-2370, *Methanosarcina thermophila* TM-1^T VKM B-1830, *Methanosarcina vacuolata* Z-761^T DSM 1232, *Methanosarcina mazei* VKM B-1637, *Methanosarcina barkeri* MS^T VKM B-1635, *Methanosarcina lacustris* ZS^T VKM B-2268, *Methanospirillum hungetei* JF-1^T DSM 864, *Methanospirillum lacunae* Ki8-1^T DSM 22751, *Methanospirillum stamsii* Pt1^T VKM B-2808, *Methanotrux thermoacetophila* Z-517^T VKM B-1831, *Methanotrix concilii* GP6^T DSM 3671 (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>).

4.3. Среда и условия культивирования

Для получения метаногенной культуры JL01 10 г образца многолетнемерзлых отложений помещали в 30-мл стеклянные флаконы, куда добавляли 5 мл основной минеральной среды, а также ацетат (10 мМ) или H₂+CO₂ (80:20) в качестве источников углерода и энергии. Культивирование проводили при 6 и 20°C.

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

Чистую культуру штамма JL01 получали на аналогичной минеральной среде с добавлением казामीновых кислот (1 г/л).

Штаммы *Methanobacterium articum* M2^T VKM B-2372^T и *M. bryantii* M.o.H^T VKM B-1629^T, используемые в сравнительных экспериментах, культивировали на среде MB, содержащей (г /л): ацетат натрия, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 0,45; K₂HPO₄, 0,29;

KH_2PO_4 , 0,18; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,06; NaCl , 5,0; витамины, 10 мл (среда 141; DSMZ); микроэлементы, 10 мл (среда 141, DSMZ); резазурин, 0,001; цистеин-HCl, 0,25; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$, 0,25. Растворы цистеин-HCl и сульфида добавляли из стерильных растворов перед посевом, доводили pH и задували H_2/CO_2 (80:20). Культивирование осуществляли при 37°C.

Штамм *M. veterum* MK4^T VKM B-2440^T выращивали на среде DSMZ 506 (Krivushin *et al.*, 2010) при 30°C, а штамм *Methanosarcina masei* S6^T VKM B-1636^T - на среде, аналогичной для штамма JL01, при 37°C.

Для выделения чистой культуры бактериального спутника штамм GLS2 использовали метод десятикратных разведений (Hungate, 1969) на модифицированной среде SM (Leadbetter & Breznak, 1996) следующего состава (г/л): NaCl , 1,0; KCl , 0,5; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1; NH_4Cl , 0,3; KH_2PO_4 , 0,2; Na_2SO_4 , 0,15; ксилоза, 20 мМ; дрожжевой экстракт, 1,0 - 3,0; NaHCO_3 , 0,5; микроэлементы SL7 (Widdel & Pfennig, 1981), 1 мл; раствор витаминов (среда DSMZ 503), 1 мл. Стерильные растворы карбоната, витаминов и ксилозы добавляли в среду из стерильных стоковых растворов перед посевом. pH доводили до 7,2-7,3 с помощью 10% NaHCO_3 . Культивирование осуществляли при 30°C.

Культивирование метаногенов для определения белковых профилей использовали среды и температуры, соответствующие каждому штамму (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>).

4.4. Микроскопические методы

Морфологию клеток Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа Zeiss Axiostar plus, а также микроскопа Nikon Eclipse Ci с камерой Jenoptic Prog Res SpeedXT^{core}5.

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов проводили по методу Рейнольдса (Reynolds, 1963). Клетки центрифугировали, затем фиксировали 1,5 % раствором глутарового альдегида в 0,5 М какодилатного буфера (pH 7,2) при 4°C в течение 1 часа. Затем клетки отмывали трижды таким

же буфером и дофиксировали 1% раствором OsO_4 на 0,05 М какодилатном буфере (рН 7.2) в течение 3 часов при 20°C. Препарат обезживали в серии спиртовых растворов и заливали в смолу Епон 812, фиксировали и окрашивали сначала 3% раствором уранил-ацетата в 70% этаноле в течение 30 минут, а затем цитратом свинца. Срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-100В.

4.5. Изучение физиолого-биохимических свойств микроорганизмов

Оптимальные условия роста исследуемых штаммов определяли на основной среде для каждого штамма по оптической плотности (OD) при 600 нм (штамм GLS2) на спектрофотометре Spacol 221 (Германия) либо по образованию метана в газовой фазе (метаногены).

Влияние температуры исследовали в диапазоне от 0 до 50°C, солености - от 0 до 20 г/л NaCl. Влияние pH среды определяли на основной среде при оптимальной температуре и солености, культивируя клетки при различных значениях pH. При необходимости значения регулировали с помощью добавления стерильного 1 М HCl, 10% (в/о) раствора NaHCO_3 или 8% (в/о) Na_2CO_3 для получения требуемого конечного значения pH.

Способность штаммов использовать различные субстраты в качестве источников углерода и энергии определяли на соответствующей основной среде при оптимальных значениях температуры, солености и pH, добавляя сахара (2 г/л), органические кислоты (2-4 г/л), спирты (120 мМ), метиламины (2 г/л), полисахариды (1 г/л), $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (80:20, о/о). Все эксперименты проводили в трех повторностях и подтверждали двумя пересевами.

Воздействие антибиотиков определяли путем переноса аликвоты культур (5 мл) на свежую среду, содержащую один из антибиотиков, и сравнивали рост данных культур с контролем.

Окраску по Граму проводили согласно методике (Buck, 1982; Murray *et al.*, 1994).

Для определения энзиматической активности штамма GLS2 использовали набор ферментативных экспресс-тестов API ZYM и руководствовались инструкциями производителя.

4.6. Аналитические методы

4.6.1. Определение уксусной кислоты и метана

Метан и ацетат определяли на газовом хроматографе Pye-Unicam (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором на стеклянной колонке (1m×2 mm), заполненной Порапаком QS 80-100 меш (Fluka, Швейцария). Температура колонки, инжектора и детектора составляла 90, 150 и 180 °C, соответственно. В качестве газа-носителя использовали азот со скоростью потока 20 мл/мин.

4.6.2. Определение водорода

Водород определяли на газовом хроматографе Shimadzu 8Ас теплопроводным детектором. Температура детектора и колонки составляла 100 и 60 °C.

4.6.3. Определение белка в биомассе

Концентрацию белка в клеточной биомассе определяли методом Бредфорда (Bradford, 1976). К аликвоте пробы (100 мкл) добавляли 1 мл раствора кумасси G-250 и определяли экстинцию при длине волны 595 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-160А. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

4.6.4. Определение каталазы и оксидазы

Активность **каталазы** определяли по образованию пузырьков после добавления к суспензии клеток 3% H₂O₂. Определение активности **оксидазы** осуществляли с помощью реагента (bioMérieux).

4.6.5. Анализ липидного состава клеток

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

4.6.6. Анализ жирнокислотного состава клеток

Биомассу обрабатывали согласно инструкциям Microbial Identification system (Sasser, 1990). Полученные экстракты эфиров жирных кислот фильтровали, пробу реакционной смеси в 1 мкл анализировали с помощью хроматографической системы Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II GC-MS при температурном режиме колонки от 120 до 300°C.

4.7. Эксперименты по влиянию перхлоратов на рост метаногенов

Действие перхлоратов на рост метаногенов оценивали путем изменения скорости образования метана из $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ и ацетата. Метаногенные штаммы выращивали в 150 мл флаконах при оптимальных условиях для каждого штамма (Shcherbakova et al., 2015). Схема проведения эксперимента представлена на Рисунке 7.

Выращенные культуры метаногенов были посеяны в 30-мл стеклянные анаэробные флаконы, содержащие 10 мл соответствующей для каждого штамма среды с 30 mM ацетата или смесью газов $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80:20, при 200 кПа). После продувки флаконов N_2 , штаммы инкубировали при соответствующих температурах. На следующий день среду анализировали на наличие ацетата и H_2 , которые затем снова добавляли в среду. Перхлораты добавляли в среду с исследуемыми штаммами в концентрациях 1, 5 и 10 mM, за исключением

контроля. Затем флаконы продували азотом и возобновляли инкубирование. Два последующих дня процедуру повторяли.

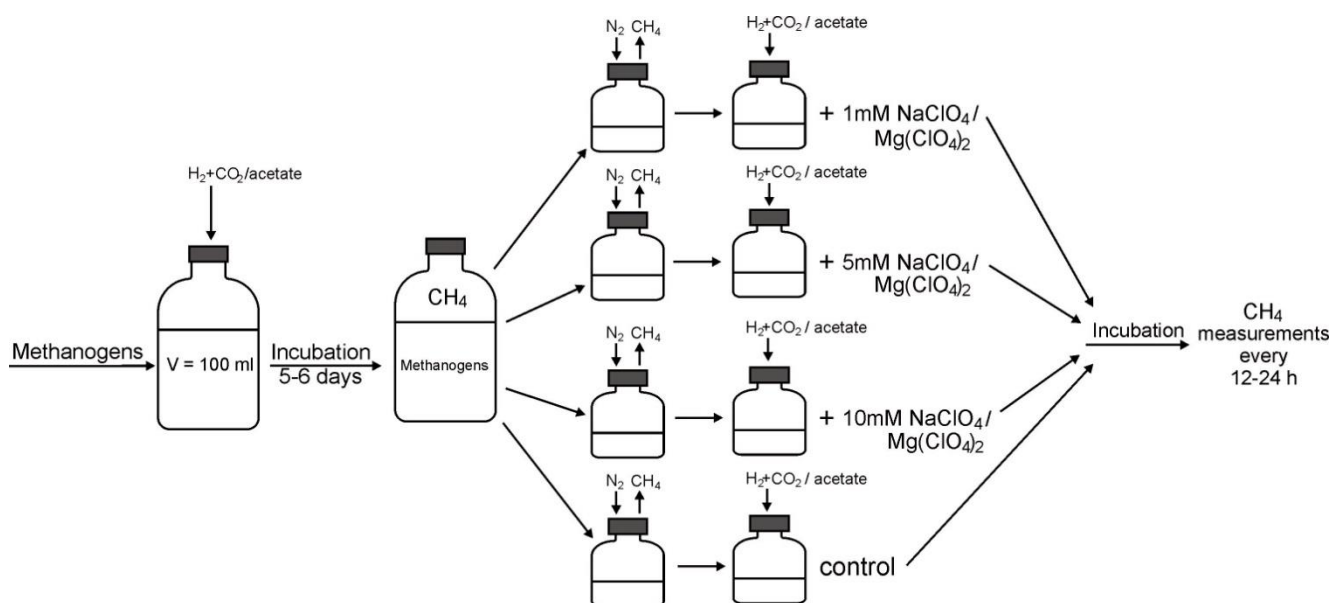


Рисунок 7. Схема эксперимента по определению ингибирующих концентраций перхлоратов на рост штаммов метаногенных архей

Через 1 ч инкубирования проверяли изменение концентрации метана в газовой фазе во всех исследуемых флаконах. Концентрацию метана измеряли в течение двух дней с интервалом 12- 24 часа. Скорость метаногенеза определяли по графику зависимости образования метана от времени.

Концентрацию перхлоратов определяли на хроматографе IC-2010 (Токио, Япония). Элюирующий раствор содержал 10 мМ NaHCO₃, 8 мМ Na₂CO₃ и 30% CH₃CN. Температура колонки составляла 40°C, скорость потока – 1.2 мл/мин. Для определения перхлоратов использовали 1 мл метаногенной культуры, которую центрифугировали при 12000 об/мин.

Ингибирующее действие (I%) перхлоратов определяли по формуле $\% I = 100 - \% \text{ АСТ}$. Концентрации перхлоратов, вызывающие 20, 50 и 80%-ное ингибирование метаногенеза, обозначались как IC₂₀, IC₅₀, и IC₈₀, соответственно.

4.8. Молекулярно-генетические методы

4.8.1. Выделение и очистка ДНК

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

Выделение и очистку хромосомной ДНК чистых культур метаногенов проводили модифицированным методом Мармура (Marmur, 1961). Сырую биомассу ресуспендировали в ТЕ-буфере (10 mM Трис-HCl pH 8.0; 1 mM ЭДТА), доведя OD₆₀₀ до 1,0. К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 2-5 мг/мл и инкубировали 30 мин при 37°C на водяной бане. После этого добавляли протеиназу К до конечной концентрации 10-20 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37°C. К суспензии добавляли 20% раствор SDS до конечной концентрации 1-2% и инкубировали 60 мин при 56°C. Затем проводили 3 цикла замораживания при -40°C и оттаивания при 65°C. Далее к раствору добавляли 5 M NaCl и 10% ЦТАБ в 0,7M NaCl до конечной концентрации 1M и 1%, соответственно. Лизат выдерживали 20 мин при 65°C, добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1), тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1), перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, экстрагировали равным объемом хлороформа и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин.

Для осаждения ДНК из отобранной верхней фазы добавляли 3 объема охлажденного 96% этанола и 0,1 объем 3M ацетата калия, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. Осадок ДНК промывали последовательно 80% и 96% растворами этанола и подсушивали на воздухе. ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Добавляли раствор РНК-азы до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 37°C. Повторяли экстракцию смесью фенола-хлороформа. ДНК из раствора осаждали этанолом или

изопропанолом как описано выше. Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoPhotometer®P-Class (Implen, Германия).

4.8.2. Амплификация генов 16S рРНК и *mcrA*

Амплификацию генов осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь содержала (25 мкл): ДНК-матрицы, 10 нг; MgCl₂, 2.5 мМ; каждого дНТФ, 0.25 мМ (Fermentas, Литва); Taq - полимеразы, 1×буфер (Fermentas, Литва); каждого праймера, 0.1 мкМ (Таблица 6).

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

Таблица 6. Праймеры, использованные в работе.

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

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

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

4.8.4. Секвенирование

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН и в Национальном институте полярных исследований (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.

4.8.5. Статистический анализ последовательностей

Последовательности клонов со сходством более чем 98% относили к одинаковым флотипам. Покрытие (C) рассчитывали по формуле: $C=1 - (n_1/N)$, где n_1 – количество уникальных флотипов (встречаемых 1 раз), а N – общее число анализируемых клонов (Good, 1953; Chao, 1987). Индексы видового разнообразия Шеннона (H) и доминирования Симпсона (D) определяли с использованием программного обеспечения “Shannon and Chao 1 index RBD” (Cole *et al.*, 2014).

4.8.6. Филогенетический анализ

Для поиска в GenBank нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* использовали программу BLAST базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности выравнивали в программе ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), объединяли в таксономические единицы в программе cd-hit (Li and Godzic, 2006), проверяли на наличие химер в программе Pintal (Ashelford *et al.*, 2005). На основе нуклеотидных

последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) были построены филогенетические дендрограммы с применением метода «neighbor-joining» и «minimum evolution» (Saitou *et al.*, 1987). Для определения таксономического положения полученных последовательностей использовали RDP Classifier v 2.5 (Wang *et al.*, 2007).

Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов JL01 и GSL2 депонированы в GenBank под номерами AF519802 и JN944166, соответственно, а последовательность *mcrA* гена штамма JL01 – под номером KY368727.

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

Содержание Г+Ц пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Mesbah *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 1985). ДНК диализовали в течение суток против 1000-кратно превосходящего объема 0.1×SSC буфера (0.15M NaCl; 0.015 M Na₃C₆H₅O₇×5.5H₂O, pH 7.0) при 4°C при медленном перемешивании на магнитной мешалке. Температуру плавления ДНК определяли на спектрофотометре DU800 Beckman Coulter в термостатируемой ячейке при температурах от 60 до 95°C со скоростью нагрева 0.5°C в минуту. Измерения проводили в трех повторностях.

*- за проведение анализа автор выражает благодарность снс, к.б.н. Е.В. Аriskиной (ИБФМ им. Г.К. Скрыбина, г. Пущино).

4.8.8. ДНК-ДНК гибридизация*

ДНК диализовали против 2×SSC, как описано выше, и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE на льду до получения фрагментов длиной 500-700 п.н. Реакцию гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora с соавт. (Rossello-Mora *et al.*, 2011).

4.9. Времяпролетная МАЛДИ-масс спектрометрия

Для анализа использовали чистые культуры метанобразующих архей, выращенные на жидких питательных средах при оптимальных условиях.

Биомассу клеток метаногенов помещали в пробирки, куда затем добавляли 50 мкл смеси, содержащей 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты, суспендировали в течение 1-2 мин. Полученные суспензии центрифугировали 1 мин при 14 000 об/мин. Супернатант использовали в качестве исследуемого образца для проведения масс-спектрометрического анализа. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия).

Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flex Control 2.4 (Build 38) и flex Analysis 2.4 (Build 11). Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.expasy.org/srs5/>).

ГЛАВА 5. Результаты и обсуждение

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

5.1. Исследование разнообразия архей в многолетнемерзлых образцах различного возраста

Для исследования разнообразия и распределения метаногенных архей в мерзлых отложениях были отобраны пять образцов, полученных из скважины, пробуренной на Колымской низменности в ходе экспедиции в район озера Якутское в 2007 году. Образцы представляли собой различные горизонты ММО: активный KL50 (верхняя часть мерзлоты, замерзающая зимой и оттаивающая летом); KL400 и KL1450 (слой с годовыми температурными колебаниями); KL1750 и KL2200 (слой с диапазоном отрицательных температур независимо от сезона) (Таблица 7).

Таблица 7. Характеристика исследованных образцов многолетнемерзлых отложений Колымской низменности

Образец	Глубина, м	Возраст, лет*	Содержание общего C _{орг} , %	CH ₄ , мм кг ⁻¹	$\delta^{13}\text{CH}_4$, ‰*
Активный слой					
KL50	0,50-0,55	н.о.	4,1	0,035	н.о.
Слой с годовыми температурными колебаниями					
KL400	4,0-4,1	н.о.	1,5	0,648	-72
KL1450	14,5-14,6	н.о.	0,8	0,313	-88
Слой с постоянными отрицательными температурами					
KL1750	17,5-17,6	23800±170	0,27	0,104	-85
KL2200	22,2-22,3	30700±390	0,34	0,503	-95

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

5.1.1. Создание клоновой библиотеки гена 16S рРНК

В результате амплификации общей ДНК, выделенной из каждого образца, с универсальными архейными праймерами и последующим клонированием, были созданы пять клоновых библиотек, объем выборки которых составил от 81 до 88 клонов с покрытием от 70 до 93% (Таблица 8).

Таблица 8. Характеристика библиотеки клонов гена 16S рРНК из исследованных образцов.

Библиотека клонов	Образцы				
	KL50	KL400	KL1450	KL1750	KL2200
Размер библиотеки (количество клонов)	83	88	80	88	81
Покрытие, %	71,1	78,4	92,5	90,9	70,3
Индекс доминирования Симпсона (D)	0,26	0,37	0,72	0,30	0,38
Индекс видового разнообразия Шеннона (H)	3,55	3,05	1,39	2,76	3,42

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

Четыре ветви филума *Euryarchaeota* включали известные метанобразующие группы: ацетокластические метаногены, относящиеся к родам *Methanosarcina* и *Methanosaeta* порядка *Methanosarcinales*; и водородиспользующие метаногены родов *Methanoregula* и *Methanocella* порядков *Methanomicrobiales* и *Methanocellales*. Филотип *Candidatus* 'Methanoperedenaceae' (Haroon *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015) порядка *Methanosarcinales* был обнаружен в четырех из пяти образцов и имел сходство по 16S рРНК с семью филотипами, три из которых относились к родственной филогенетической группе *Methanoregulaceae* порядка *Methanomicrobiales*. (Рисунок 8).

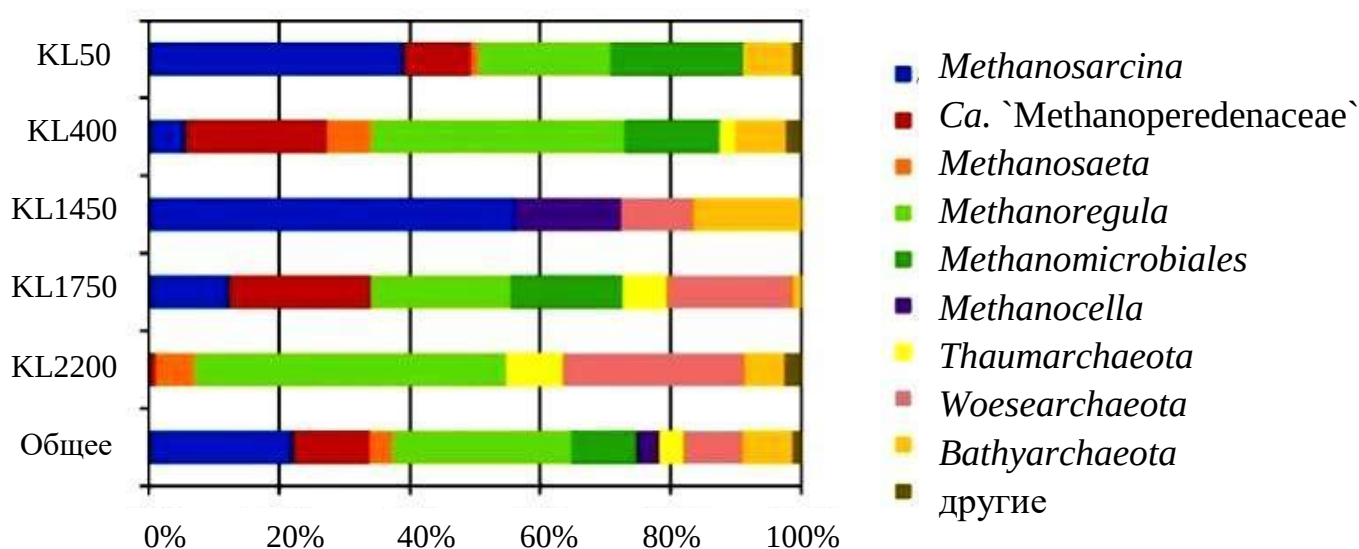


Рисунок 8. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов 16S рРНК указанных архей из образцов многолетнемерзлых пород.

В дополнение к метаногенной составляющей, в образцах KL50, KL400, KL2200 присутствовал минорный филотип (1,2-2,5% клонов), относящийся к порядку *Thermoplasmata*, который включал группу MBG-D (KL-16S-OTU35 и KL-

16S-OTU26). На основании молекулярного и филогенетического анализа, проведенного Пауль с соавторами (Paul *et al.*, 2012), микроорганизмы данной группы содержат *mcrA* ген и, вероятнее всего, могут осуществлять метаногенез.

Две ветви *Thaumarchaeota* включали три филотипа относящихся к C3 и SCG группам архей близкородственным роду *Nitrososphaera* (Steiglmeier *et al.*, 2014). Филогенетическая группа *Woesearchaeota*, главным образом, группа DHVEG-6 включала 11 филотипов, большинство из которых были обнаружены в образце KL2200 (Рисунок 8 и 9).

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, Таблица 1). Так, филотип KL-16S-OTU0 (22.1% общего числа клонов), чьим близким родственником оказался вид *Methanoregula formicica* (97% сходства), был идентичен с филотипом, полученным из образцов устья Жемчужной реки в Китае на глубине 1,5 м (Chen *et al.*, 2014).

Вторая большая группа клонов (8,8%), относящаяся к филотипу KL-16S-OTU4, представляет новое семейство порядка *Methanomicrobiales* (Рисунок 2) и включает последовательности, полностью совпадающие с последовательностями, обнаруженными в образцах отложений Цинхай-Тибетского нагорья, Китай (Приложение 2).

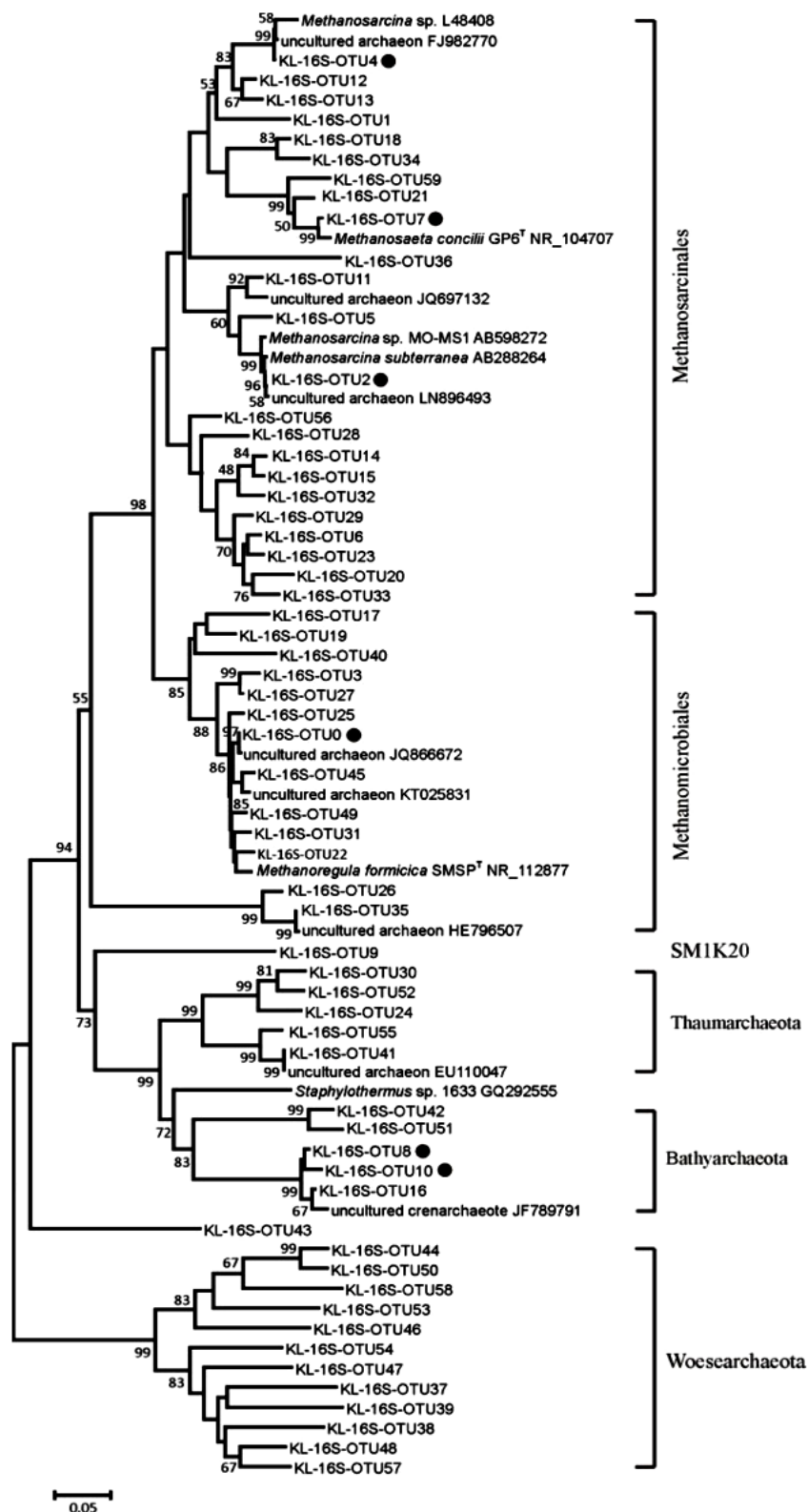


Рисунок 9. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (~517 п.о.) образцов многолетнемерзлых отложений. Черными точками отмечены флотипы, обнаруженные более, чем в трех образцах. Дендрограмма построена с использованием метода “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”- анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

5.1.2. Создание клоновой библиотеки гена *mcrA*

Выборка библиотеки клонов гена *mcrA* включала от 43 до 59 клонов, а общее количество флотипов составило 37 (Таблица 9). В каждом образце ММО были обнаружены от 3 до 23 таксономических групп архей. Покрытие составило 59-95%, что выше средних значений, необходимых для достоверной характеристики разнообразия в библиотеках.

Таблица 9. Характеристика библиотеки клонов гена *mcrA* исследованных образцов многолетнемерзлых отложений.

Библиотека клонов	Образцы				
	KL50	KL400	KL1450	KL1750	KL2200
Размер библиотеки (количество клонов)	43	57	59	55	58
Покрытие, %	86.0	59.6	94.9	92.7	82.8
Индекс доминирования Симпсона (D)	0.96	0.20	1.04	0.93	0.78
Индекс видового разнообразия Шеннона (H)	1.52	3.80	1.15	1.44	2.07

Большая часть метаногенных флотипов была обнаружена на глубине 4 м (KL400), меньшая - на глубине 14,5 м (KL1450).

32% общего количества последовательностей *mcrA* гена были отнесены к роду *Methanosarcina*, 35% - *Methanoregula*, 9% - *Methanobacterium*. К флотипу *Ca. 'Methanoperedenaceae'* относилось 22% последовательностей, обнаруженных только в образцах трех самых нижних из исследованных горизонтов (Рисунок 10).

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

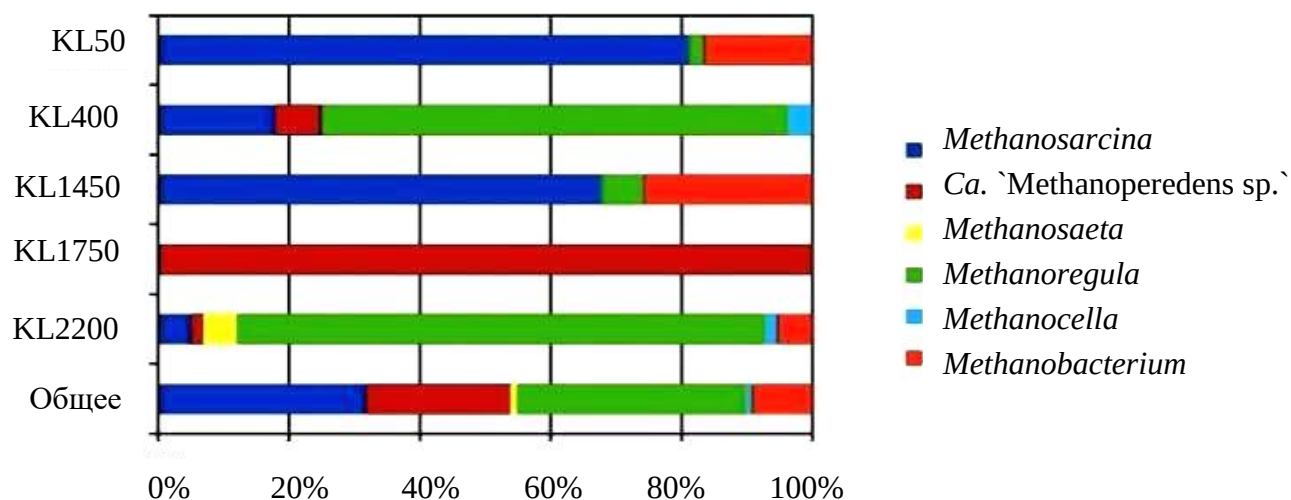


Рисунок 10. Частота встречаемости клонов, содержащих амплифицированные фрагменты генов *mcrA* в исследуемых образцах многолетнемерзлых пород.

Последовательности гена *mcrA*, полученные в нашем исследовании, были отнесены к классам *Methanobacteria* и *Methanomicrobia*. Доминирующим оказался класс *Methanomicrobia*, который, в свою очередь, включал филотипы, относящиеся к порядкам *Methanocellales* (3 ОТЕ), *Methanomicrobiales* (9 ОТЕ) и *Methanosarcinales* (16 ОТЕ) (Рисунок 11).

Значительные отличия между метаногенными археями по последовательностям *mcrA* гена были обнаружены в образцах KL1450 и KL2220. Более 60% всех исследованных клонов представляли метаногенные филотипы, использующие для роста и получения энергии CO_2 и H_2 .

Помимо метаногенных филотипов, обнаруженных в библиотеке клонов гена 16S рРНК, в трех образцах (KL50, KL1450 и KL2200) были также найдены филотипы рода *Methanobacterium*. Два из них могут представлять новые таксоны, в то же время две другие последовательности были идентичны последовательностям гена *mcrA* гидрогенотрофного *Methanobacterium* sp. штамм SMA-27, выделенного из многолетнемерзлого образца острова Самойловский (Россия).

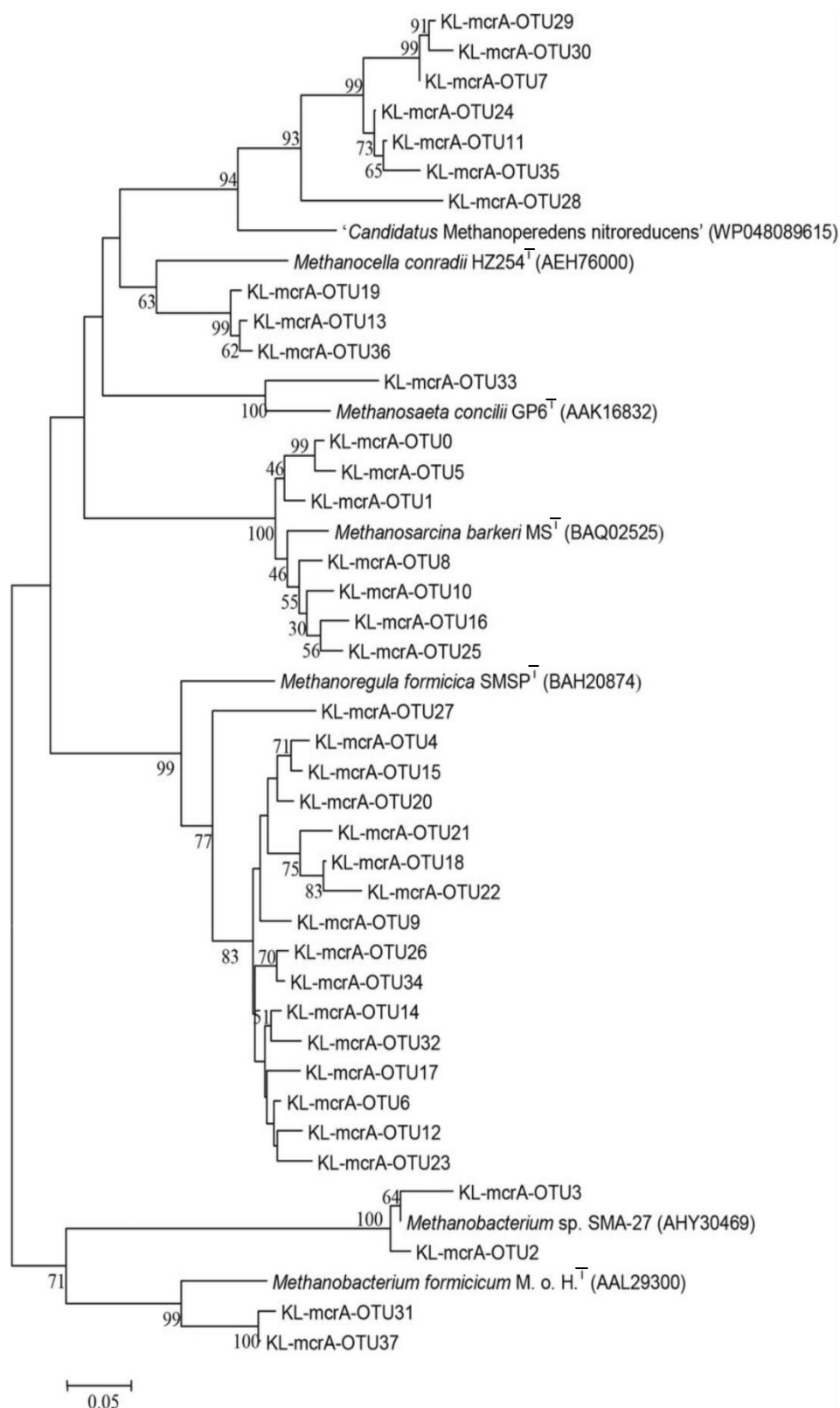


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов *mcrA* гена (142 п.о.) образцов многолетнемерзлых отложений. Степень ветвления определена методом “neighbor-joining”. Данные “bootstrap”-анализа (выраженные в процентах от 1000 реплик) указаны в точках ветвления.

Результаты исследования образцов вечной мерзлоты молекулярно-генетическими методами показали, что во всех образцах присутствовали археи. Представители неметаногенных архей филума *Bathyarchaeota* были также обнаружены во всех исследуемых образцах.

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

Проведенные исследования показали, что в отбираемых образцах по мере увеличения глубины увеличивалось метаногенное биоразнообразие, что, вероятно, является результатом преобладания анаэробных условий. Но также нами было обнаружено снижение разнообразия метаногенных архей в образцах KL1450 и KL1750. Однако в образце KL2200, взятом из самого глубокого горизонта, количество метаногенных филотипов неожиданно возросло. Количество общего органического углерода в исследуемых образцах понижалось в зависимости от глубины и достигло минимального значения (0,27-0,37%) на глубине 17-17,5 м (KL1750) и 22-22,5 м (KL2200). Возможно, в более глубоких горизонтах ММО содержались органические соединения более доступные для метаногенов такие, как метиламины или ацетат, а также водород, который используют гидрогенотрофные метаногены. Однако, это предположение требует более тщательных исследований. Кроме того, есть основание полагать, что процесс смещения метана во время промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться отжатию (миграцией) микробных клеток, что объясняет их разнообразие.

В четырех из пяти исследуемых образцов были обнаружены филотипы, относящиеся к роду *Methanoregula*. На данный момент этот род включает два вида – *Methanoregula formicica* и *M. boonei*, относящиеся к облигатным

мезофильным водородиспользующим метаногенам, выделенным из кислых болот и анаэробного биореактора (Brauer *et al.*, 2006; Yashiro *et al.*, 2011). Таким образом, соотношение водород- и ацетатиспользующих фило типов в исследуемых образцах подтверждает ранее выдвинутое предположение о преобладании водородпотребляющих метаногенов в многолетнемерзлых отложениях (Rivkina *et al.*, 2007).

Метаногенные археи, обнаруженные в данном исследовании, относились к культивируемым и некультивируемым порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanobacteriales*. Семь фило типов порядка *Methanosarcinales* были идентифицированы как представители ранее предложенного семейства *Ca. 'Methanoperedenaceae'* (Haroony *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2015). В настоящее время данное семейство не имеет культивируемых представителей. Основываясь на данных геномов, авторы описания предполагают, что *Ca. 'Methanoperedenaceae sp.'* может получать энергию в процессе анаэробного окисления метана (АОМ) с использованием нитрата как конечного акцептора электронов.

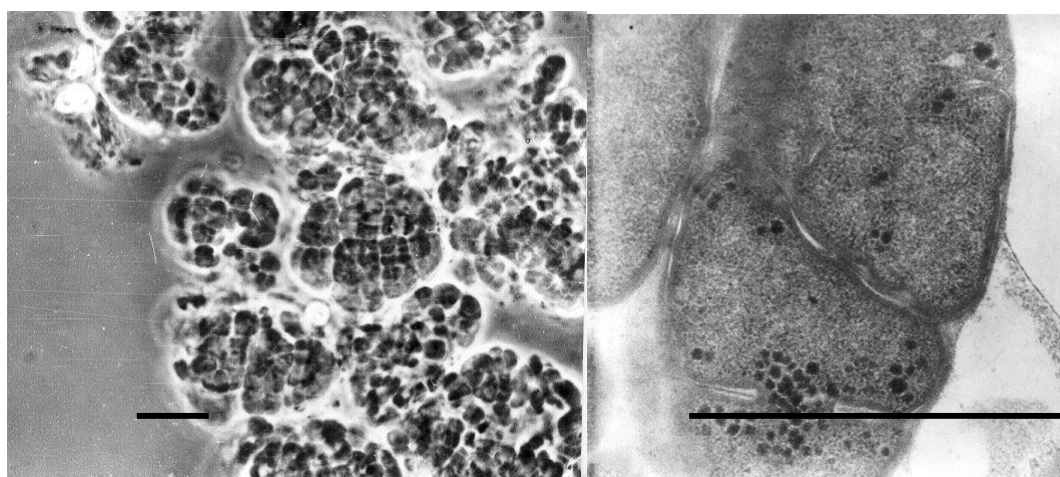
Таким образом, в результате наших исследований впервые удалось идентифицировать представителей архейного микробного сообщества пяти арктических метаносодержащих образцов вечной мерзлоты различного возраста и представляющих горизонты различных температурных режимов.

5.2. Описание нового вида метаносарцины

Методом длительного анаэробного культивирования при 15°C с использованием ацетата в качестве источника углерода в присутствии пенициллина и образцов голоценовых многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (северо-восток России, 70°06'N, 154°04'E) была получена бинарная метаногенная культура. В последствие, методом клонирования был определен бактериальный спутник и обозначен нами как штамм GLS2. Путем многократных пересевов с антибиотиками различных классов нам удалось получить чистую

культуру метаногена, обозначенную нами как штамм JL01^T, и охарактеризовать ее.

Клетки штамма JL01^T были неподвижны, окрашивались по Граму положительно и представляли собой нерегулярные кокки 1,0-1,5 мкм в диаметре, располагающиеся в виде агрегатов (Рисунок 12). Клетки окрашивались по Граму положительно. Некоторые клетки имели электронно-плотные включения, вероятно, полифосфаты. На твердых питательных средах штамм JL01^T образовывал желтые зернистые колонии 1-3 мм в диаметре после 14-16 дней культивирования, а на жидких средах - небольшие, оседающие на дно агрегаты.



А

Б

Рисунок 12. Микрофотографии клеток штамма JL01^T. А – фазовый контраст, величина масштабной линейки 10 мкм; Б - ультратонкие срезы, величина масштабной линейки 1 мкм.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма JL01^T (1336 п.о.) была получена ранее и депонирована в GenBank под номером AF519802. 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) (Рисунок 13).

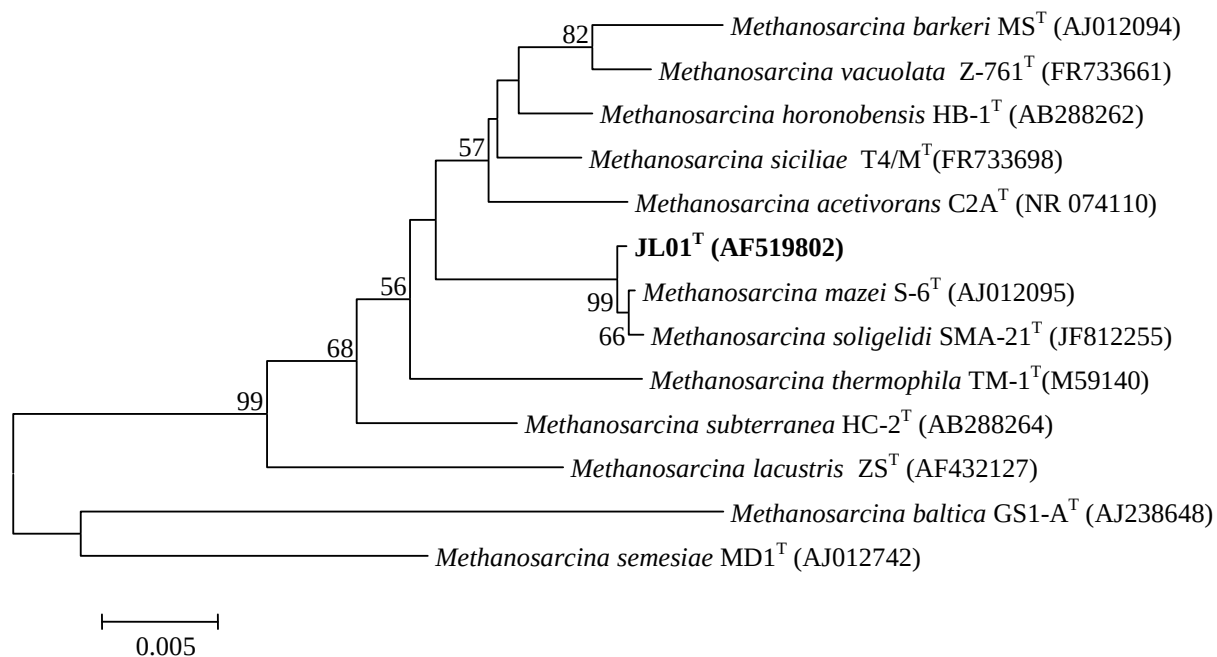


Рисунок 13. Филогенетическая дендрограмма последовательностей генов 16S рРНК, показывающая положение штамма JL01^T относительно типовых штаммов других видов рода *Methanosarcina*; вероятность ветвления была получена методом «neighbor-joining». Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Штамм JL01^T был мезофилом, рос при температуре от 10 до 37°C (оптимальный рост при 24-28°C), тогда как референтный штамм S-6^T - от 20 до 50°C (оптимальный рост при 37° C) (Рисунок 14) и нейтрофилом, растущим в диапазоне рН от 5,5 до 8,5 (оптимум 6,8-7,3).

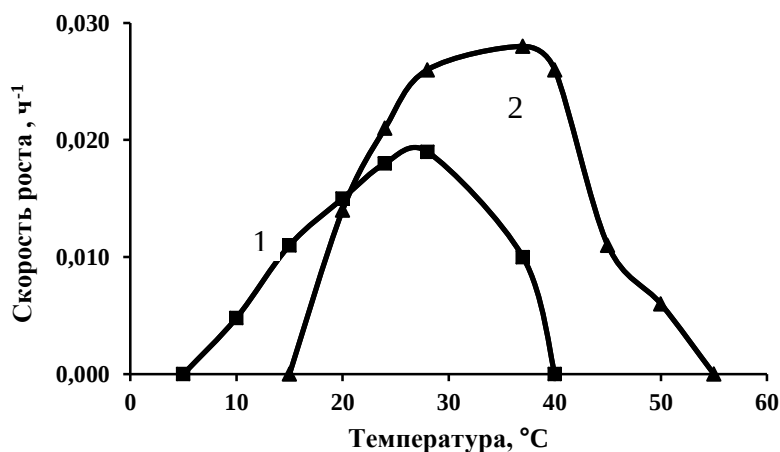


Рисунок 14. Влияние температуры на рост штаммов JL01^T (1) и S-6^T (2) на метаноле.

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 NaCl.

Из всех протестированных субстратов метанол ($0,038 \text{ ч}^{-1}$), ацетат ($0,027 \text{ ч}^{-1}$), метиламин ($0,014 \text{ ч}^{-1}$), диметиламин ($0,013 \text{ ч}^{-1}$) и триметиламин ($0,028 \text{ ч}^{-1}$) поддерживали рост и метаногенез штамма JL01^T. Рост не наблюдался на H₂+CO₂, H₂+метаноле, H₂+этаноле, пропионате, бутирате, формиате, лактате, дрожжевом экстракте.

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

Сравнение транслированной аминокислотной последовательности гена А субъединицы метил-коэнзим М редуктазы (*mcrA*) штамма JL01^T с другими последовательностями этого гена типовых штаммов всех видов рода *Methanocarcina* показало, что *mcrA* ген штамма JL01^T на 99,4% идентичен подобному гену *M. horonobensis* HB-1^T, в то время как идентичность с *mcrA* генами *M. mazei* и *M. solidgelidi* составила 93,1 и 96,2%, соответственно (Рисунок 15).

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

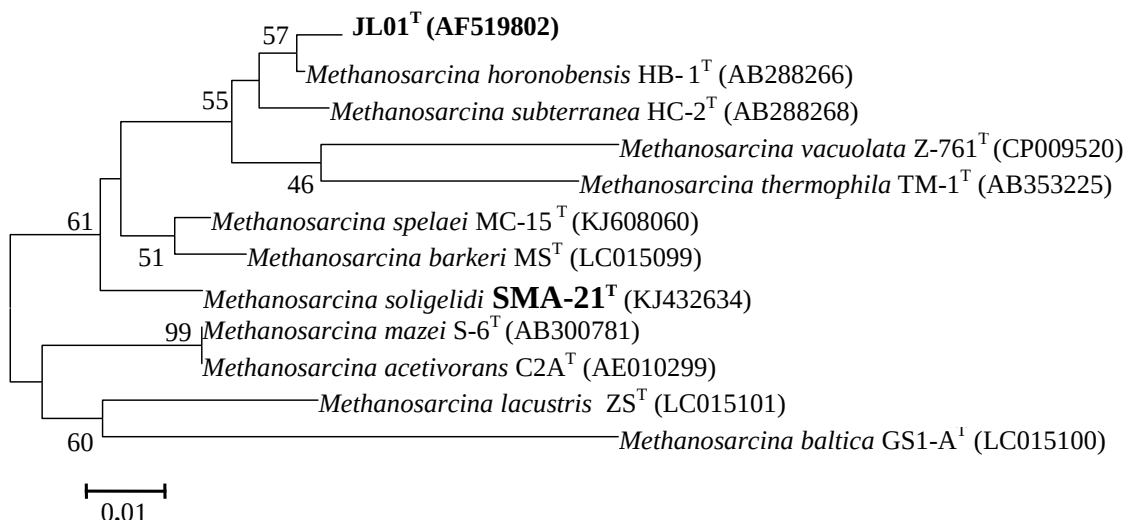


Рисунок 15. Филогенетическая дендрограмма транслированных аминокислотных последовательностей *mcrA* генов (159 aa), показывающая положение штамма JL01^T относительно других типовых штаммов других видов рода *Methanosarcina*; вероятность ветвления была получена методом «neighbor-joining». Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Сравнение фенотипических характеристик штамма JL01^T с типовыми штаммами близкородственных видов показало, что все они имеют сходные оптимальные параметры роста. Однако штамм JL01^T отличается 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 штаммов JL01^T и штамма S-6^T составило 39,2 и 42,3 мол%, соответственно. А уровень ДНК-ДНК гибридизации (26,2 ± 2,7%) показал, что штаммы принадлежат разным видам (Таблица 10).

Таблица 10. Сравнительная характеристика штамма JL01^T с близкородственными видами метаносарцин.

Штаммы: 1 - JL01^T (данные нашего исследования); 2 - *M. mazei* DSM 2053^T (Mah, 1980), * - наши исследования; 3 - *M. soligelidi* SMA-21^T (Wagner *et al.*, 2013)

Признаки	1	2	3
Морфология	Псевдосарцины	Псевдосарцины, псевдококки	Псевдококки
Диаметр, мкм	1,0-1,5	1,0-3,0	1,3-2,5
Окраска по Граму	+	-	-
Температура, °C Диапазон (оптимум)	10-37 (24-28)	20-50 (30-40)	0-54 (28)
pH Диапазон (оптимум)	5,5-8,5 (6,8-7,3)	5,5-8,5 (6,0-7,0)	4,8-9,9 (7,8)
NaCl, М Диапазон (оптимум)	0,01-0,2 (0,075-0,1)	0,1–1,0 (0,1-0,3)*	0,02-0,6 (0,02)
Г+Ц, мол.%	39,2	42,0	40,9
Субстраты	Метанол, ацетат, метиламины	Метанол, ацетат, метиламины, H ₂ /CO ₂ *	Метанол, ацетат, H ₂ /CO ₂
Источник выделения	Вечная мерзлота, Арктика, Россия	Биореактор, США	Вечная мерзлота, Арктика, Россия

Таким образом, получены убедительные данные о таксономической обособленности штамма JL01^T в рамках рода *Methanosarcina*, для которого нами предложено название '*Methanosarcina gilichinskiia*' sp.nov.

Диагноз '*Methanosarcina gilichinskiia*' sp. nov.

'*Methanosarcina gilichinskiia*' (L. fem. adj. *gilichinskiia*, в честь Давида Гиличинского, инициатора исследований микроорганизмов вечной мерзлоты).

Клетки грамположительные неподвижные нерегулярные кокки, имеют

включения полифосфатов. Встречаются в составе агрегатов. Строгий анаэроб. Метан получает из метанола, уксусной кислоты и метиламинов. Не растет на H_2+CO_2 , H_2 +метаноле, H_2 +этаноле, пропионате, бутирате, формиате, лактате, дрожжевом экстракте.

Пенициллин, ванкомицин, эритромицин и канамицин не влияют на рост. Не нуждается в факторах роста, но витамины, триптиказа и казаминовые кислоты стимулируют рост. Рост наблюдается при температуре 10-37°C (оптимальная 24-28°C), при pH 5,5-9,0 (оптимальный pH 6,8-7,3), и в присутствии NaCl от 0,01 до 0,2 М (оптимальный, 0,075 - 0,1 М NaCl). Содержание Г+Ц пар в ДНК составляет 39,2% мол.

Типовой штамм JL01^T (=VKM B-2370^T=JCM 31898^T) был выделен из многолетнемерзлых отложений голоценового возраста Колымской низменности, Россия. Последовательности генов 16S рРНК и mcrA депонированы в GenBank под номерами AF519802 и KY368727, соответственно.

5.3. Бактериальный спутник '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01^T.

Из метаногенной культуры JL01 нами выделен и охарактеризован бактериальный штамм GLS2^T (Troshina et al., 2015), представляющий собой сферические клетки, часто образующие более сложные структуры. Полученные данные о свойствах '*M. gilichinskiia*' JL01^T и штамма GLS2^T позволили нам выдвинуть гипотезу о решающем значении тесной ассоциации архей и бактерий в метаногенных сообществах многолетнемерзлых отложений, характеризующихся низким содержанием органических веществ.

Впервые неподвижная спирохета с необычной кокковидной морфологией была выделена в 2006 году и получила название *Spirochaeta coccoides* (Droge et al., 2006). Позже в семействе *Spirochaetaceae* был предложен новый род *Sphaerochaeta* (Ritalahti et al., 2012), и ко времени выделения нами нового штамма GLS2^T этот род объединял три вида с валидированными названиями: *S. coccoides* (Droge et al., 2006; Abt et al., 2012), *S. globosa* (Ritalahti et al., 2012) и *S. pleomorpha* (Ritalahti et al., 2012).

5.3.1. Описание *Sphaerochaeta associata* GLS2^T sp.nov.

Штамм GLS2^T был выделен нами из метаногенной культуры и, несмотря на бактериальную природу, был устойчив к действию широкого спектра антибиотиков, используемых при выделении метанобразующих архей. Эти ассоциированные с '*M.gilichinskii*' JL01^T бактерии несколько лет находились в условиях минеральных метаногенных сред, где источником углерода служил ацетат или метанол. Методом клонирования бактериальный спутник был идентифицирован как представитель рода *Sphaerochaeta*, что позволило подобрать необходимые условия для получения его чистой культуры методом предельных разведений в жидкой среде и последующим получением отдельных колоний на твердой среде. Штамм GLS2^T образовывал на твердой среде круглые рыхлые палевые колонии диаметром 2-3 мм.

Микроскопические исследования показали, что новая бактерия представляла собой неподвижные клетки сферической или овальной формы, размерами от 0,2 до 1-2 мкм, часто объединяющиеся в агрегаты различных размеров (Рисунок 16 А, Б), напоминающие шары. Подобные структуры, состоящие из нескольких десятков клеток, были особенно заметны в экспоненциальной фазе роста культуры, в то время как в стационарной фазе роста культура находилась в виде индивидуальных клеток. Также отмечались одиночные яркие сферические тела размером около 4 мкм. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) удалось выявить другой тип морфологии, а именно, клетки в виде колец (Рисунок 16 В), а также определить грамотрецательный тип клеточной стенки (Рисунок 16 Г).

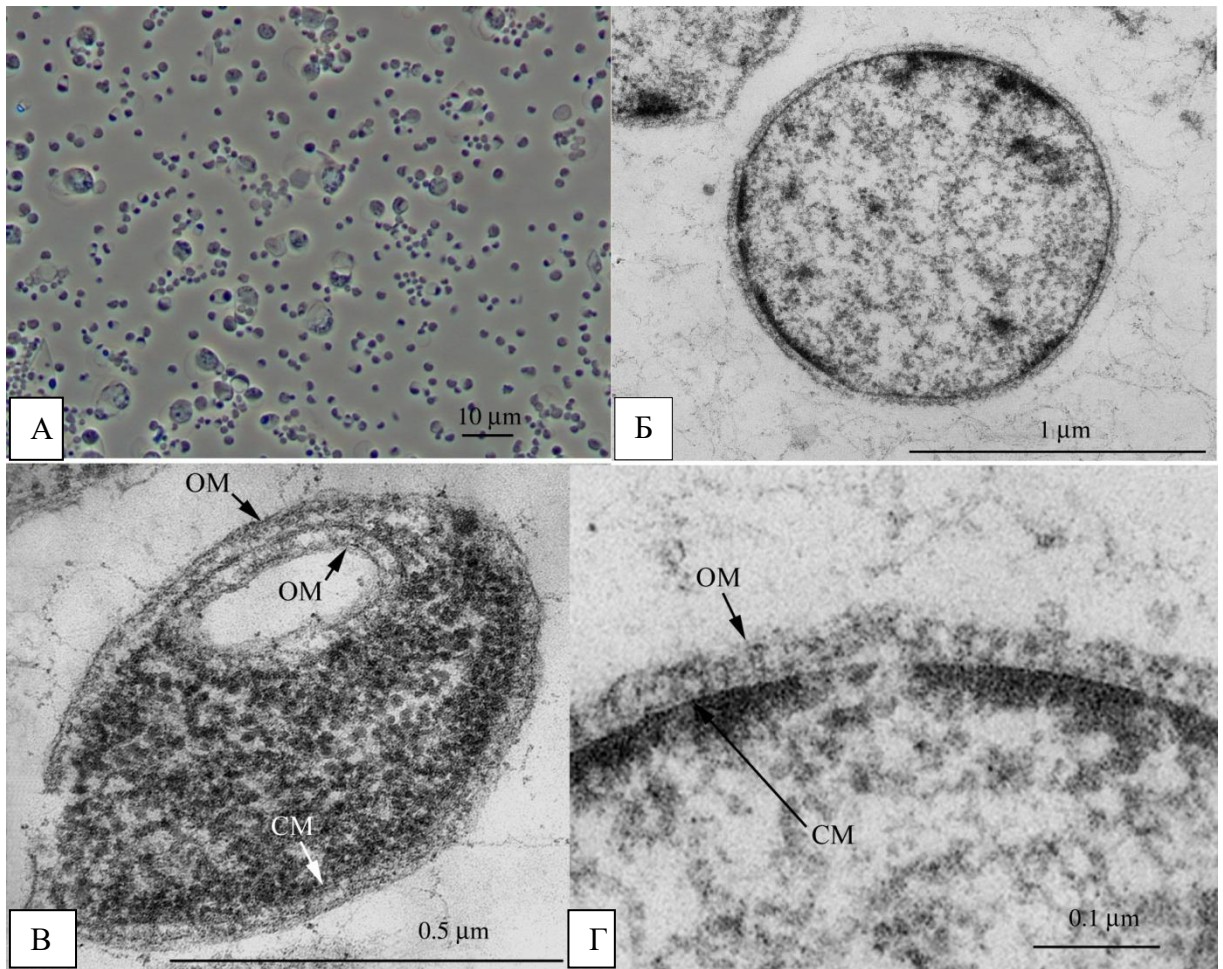


Рисунок 16. Микрофотографии клеток штамма GLS2^T: фазовый контраст (А); трансмиссионный электронный микроскоп, негативно окрашенные ультратонкие срезы – коккоидные клетки (Б), клетка в виде кольца (В), клеточная стенка (Г). Условные обозначения:СМ- клеточная мембрана; ОМ – наружная мембрана.

Штамм GLS2^T, как и другие виды этого рода *S. globosa* Buddy^T и *S. pleomorpha* Grapes^T, рос в присутствии ампициллина. Секвенирование геномов штаммов Buddy^T и Grapes^T показало отсутствие нескольких генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки, участвующие в процессах трансгликозилирования и транспептидации на заключительных стадиях синтеза пептидогликана (Caro-Quintero *et al.*, 2012). По-видимому, штаммы Buddy^T и Grapes^T, а также наш изолят GLS2^T синтезируют нежесткую дефектную клеточную стенку, которая определяет сферическую разнообразную морфологию. Эти бактерии могут рассматриваться как стабильные организмы L-формы сферопластного типа. Электронная микроскопия клеток GLS2^T, выращенных с

ампициллином в обычной основной солевой среде, показала многочисленные формы без явной клеточной стенки (Рисунок 17). Некоторые из этих клеток имели очень небольшие размеры (около 100 нм) и, по-видимому, были образованы путем экструзии мембраны (Рисунок 17, А) с образованием визикул, приводящим к мелким вздутиям (Рисунок 17, Б). Такой механизм распространения клеток был ранее предложен для L-форм грамположительной бактерии *B. subtilis* (Leaver *et al.*, 2009) и как возможный способ деления клеток на ранних этапах эволюции перед возникновением клеточной стенки. Клетки GLS2^T, выращенные в присутствии ампициллина, могли проходить через стерильную мембрану размером пор 0,22 мкм, после чего наблюдался рост культуры.

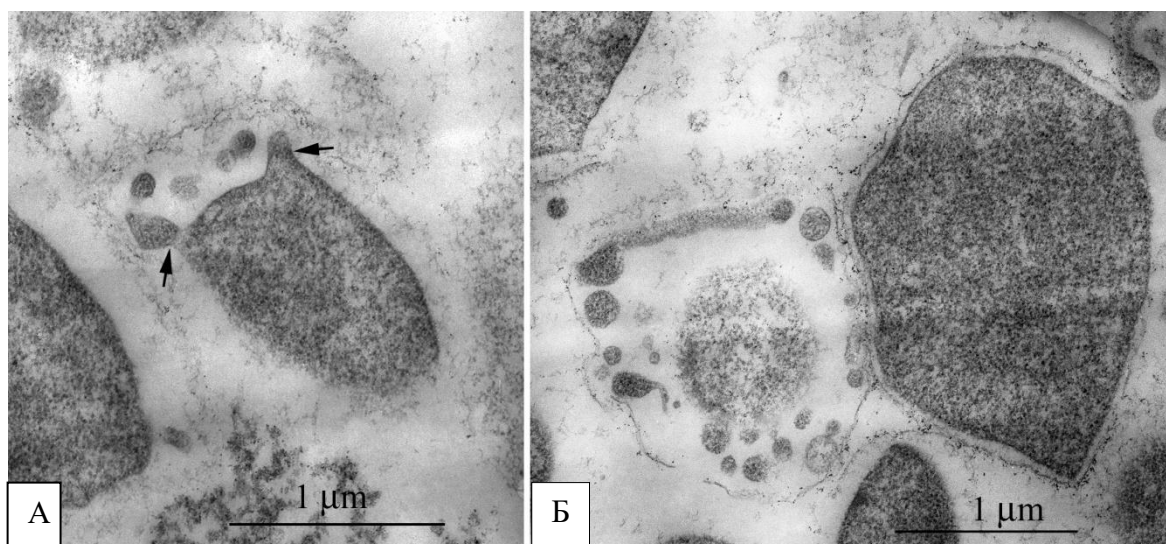


Рисунок 17. Ультратонкие срезы клеток штамма GLS2^T, выращенные с ампициллином.

Нами была получена нуклеотидная последовательность гена 16S рНК штамма GLS2^T (1504 п.о.) и депонирована в GenBank под номером JN944166. Сравнение нуклеотидной последовательности штамма GLS2^T с имеющимися последовательностями генов 16S рНК в GenBank показало, что исследуемый штамм образует единый кластер с представителями рода *Sphaerochaeta* и имеет наибольшее сходство (99,3%) с *S. globosa* Buddy^T (Рисунок 18).

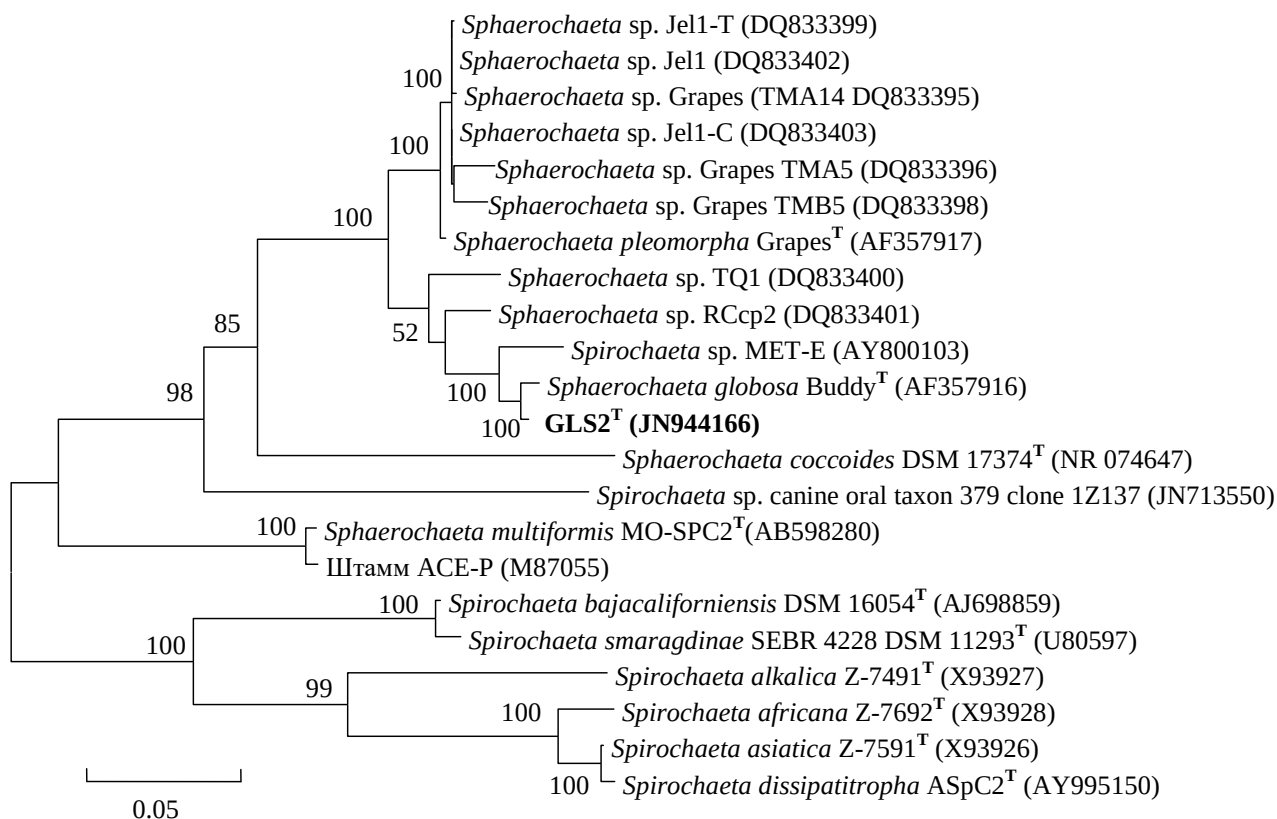


Рисунок 18. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения генов 16S рРНК изолятов, относящихся к родам *Sphaerochaeta* и *Spirochaeta*, и показывающее положение штамма GLS2^T. Степень ветвления была получена методом neighbor-joining. Номера последовательностей в GenBank даны в скобках.

Исследование физиологических и биохимических свойств штамма GLS2^T показало, что бактерия не росла под ватной пробкой или в микроаэрофильных условиях. Хороший рост наблюдался только при добавлении в среду восстановителей, поэтому штамм GLS2^T является строгим анаэробом. Культура росла в диапазоне температур от 20 до 40°C, с оптимумом при 30-34°C. Оптимальное значение pH для роста составляло 6,8-7,5, однако рост также наблюдался при pH от 5,7 до 8,2. Штамм GLS2^T нуждался в 0,02-0,03 М NaCl для оптимального роста. Присутствие NaCl в концентрации 0,08 М и выше ингибировало рост.

В качестве источников углерода и энергии для роста новая бактерия – спутник использовала моно-, ди- и трисахариды. Хороший рост наблюдался на арабинозе, ксилозе, мальтозе, галактозе, рафинозе и целлобиозе, более слабый – на глюкозе, лактозе, сахарозе и крахмале. Штамм не использовал лактозу, сахарозу, крахмал, фруктозу, целлюлозу, ксилан или дрожжевой экстракт. Штамм рос на лактате и глюкуроновой кислоте, но не мог использовать другие органические кислоты (малат, цитрат, пируват, бензоат, фумарат, пропионат, ацетат) также этанол, метанол, триметиламин, галактозамин и $H_2 + CO_2$. Для роста на всех субстратах требовался дрожжевой экстракт. Также как *S. globosa* штамм Buddy^T (Ritalahti *et al.*, 2012) при росте на ксилозе изолят мог ассимиляционно восстанавливать цитрат Fe(III) или EDTA-Fe(III) до Fe(II). При росте на ксилозе штамм GLS2^T не восстанавливал сульфат, тиосульфат, сульфит и нитрат. Кроме того, сульфит полностью ингибировал его рост.

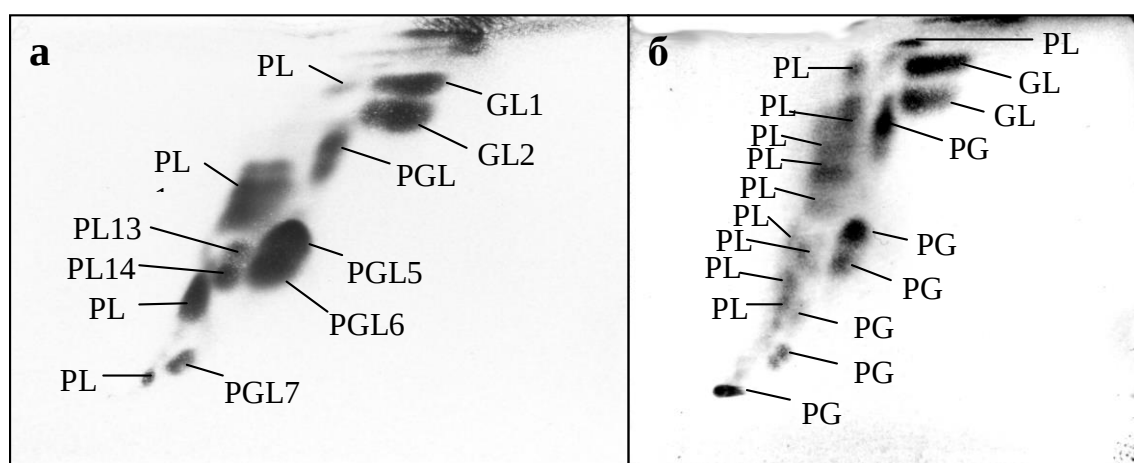


Рисунок 19. Тонкослойная хроматограмма экстрактов полярных липидов из: а – *S. globosa* Buddy^T, б – штамм GLS2^T. GL – неидентифицированные гликолипиды; PL – неидентифицированные фосфолипиды; PGL – неидентифицированные фосфогликолипиды.

Анализ полярных липидов клеток штамма GLS2^T показал, что в их состав входят гликолипиды, фосфолипиды и фосфогликолипиды (Рисунок 19, а). Однако, липидный профиль исследуемого штамма в значительной степени отличался от липидного профиля близкородственного штамма Buddy^T (Рисунок

19, б) и других представителей рода *Sphaerochaeta* (Miyazaki *et al.*, 2014).
Изопреноидные хиноны в дыхательной цепи не были обнаружены.

Нами были определены ферментные активности штаммов GLS2^T и Buddy^T (Таблица 11).

Таблица 11. Сравнение ферментных активностей штаммов GLS2^T и Buddy^T, определенные с помощью тестов api®ZYM (BioMe'rieux).

Ферментная активность	GLS2 ^T	Buddy ^T
щелочная фосфатаза	+(5)	+(5)
эстераза (C ₄)	-	+/(3)
эстераза липаза (C ₈)	-	+/(3)
липаза (C ₁₄)	-	+/(3)
лейцинариламидаза	-	-
валинариламидаза	+(5)	-
цистеинариламидаза	-	-
трипсин	-	-
β -химотрипсин	-	-
кислая фосфатаза	+(5)	+(5)
нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	+(5)	+(5)
α -галактозидаза	+(5)	+(5)
β -галактозидаза	+/(2-3)	+/(2-3)
β -глюкоуронидаза	-	-
α - глюкозидаза	-	-
β - глюкозидаза	-	-
N-ацетил- β -глюкозамидаза	-	-
α - маннозидаза	-	-
α- фукозидаза	-	-

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

Таблица 12. Состав жирных кислот клеточных стенок штаммов GLS2^T и Buddy^T.

Обозначения: ALDE, альдегид; DMA, диметил ацеталь; 2-ОН, 2-гидроксид, 3-ОН, 3-гидроксид.

Жирные кислоты	GLS2 ^T	Buddy ^T
C _{14:0}	10.5	6.4
3ОН C _{14:0}	2.0	1.1
C _{14:0} DMA	2.7	5.5
C_{14:0} сумма	15.2	13.0
C _{16:0}	14.3	3.6
3-ОН C _{16:0}	16.9	15.2
C _{16:0} ALDE	2.1	3.6
C _{16:0} DMA	20.1	20.7
C_{16:0} сумма	53.4	43.1
C _{16:1n8c}	2.5	0.0
C _{16:1n8t}	12.4	4.7
C _{16:1} ALDE	2.0	1.9
C _{16:1n8c} DMA	1.0	1.3
C _{16:1n8t} DMA	6.5	11.7
C_{16:1} сумма	24.4	19.6
2-ОН C _{18:0}	0.0	2.3
C _{18:0} DMA	0.0	1.1
C_{18:0} сумма	0.0	3.4
C _{18:1n9c}	0.9	1.5
C _{18:1n9t}	2.0	3.2
C _{18:1} DMA	0.0	10.8
C_{18:1} сумма	2.9	15.5
C _{20:4n6}	0.0	1.8
Сумма жирных кислот	95.9	96.4

Основными жирными кислотами клеточных стенок штамма GLS2^T были C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:0} 3-ОН и C_{16:1}. Также были обнаружены диметилацетали C_{16:0} DMA и C_{16:1} DMA (Таблица 12). Интересным оказался факт, что, C_{16:0} DMA составляет около 20% всех жирных кислот как в клеточных стенках штамма GLS2^T, так и штамма Buddy^T. Другим важным компонентом был C_{16:0} 3ОН (16%). Жирнокислотный профиль штамма GLS2^T отличался от профиля штамма Buddy^T отсутствием или низким содержанием C₁₈ жирных кислот таких как C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:1} DMA (Таблица 12).

Содержание Г + Ц пар в ДНК штаммов GLS2^T и штамма Buddy^T составило 47,2 и 48,9 мол%, соответственно. А уровень ДНК-ДНК гибридизации (34,7 ± 8,8%) показал, что штаммы относятся к разным видам.

На основании сравнения морфологических, физиологических, генотипических и филогенетических свойств штамма GLS2^T и типовых штаммов других видов рода *Sphaerochaeta* (Таблица 13) нами был предложен новый вид *Sphaerochaeta associata*.

Диагноз *Sphaerochaeta associata* sp.nov.

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

Клетки грамотрицательные неподвижные, кокковидные, иногда в виде кольца размером 0,2-4 мкм. Штамм анаэробный оксидазо- и каталазоотрицательный, хемоорганогетеротроф. Образует кислотные и щелочные фосфатазы, нафтол-AS-BI-фосфогидролазу, α-галактозидазу, валинариламидазу. Для роста использует моно-, ди- и трисахариды. Требуется дрожжевой экстракт для роста на всех субстратах. Не растет на фруктозе, целлюлозе, ксилане, дрожжевом экстракте, а также на ряде органических кислот, этаноле, метаноле, триметиламине и H₂+CO₂. Рост наблюдался при температуре 20-40°C (оптимальная 30-34°C), при pH 5,7 – 8,2 (оптимальный 6,8-7,5) и оптимальной концентрацией NaCl 0,02-0,03 М. Штамм устойчив к ампициллину, карбенициллину, цефепиму, ванкомицину, рифампицину, стрептомицину и чувствителен к канамицину, эритромицину и тетрациклину.

Типовой штамм GLS2^T (=DSM 26261^T = VKM B-2742^T) был выделен из бинарной культуры с '*M. gilichinskiia*' JL01 (=VKM B-2370). Содержание Г+Ц пар в ДНК типового штамма составляет 47,2±0,8 мол%.

Таблица 13. Дифференциальные свойства штамма GLS2^T и типового штамма *Sphaerochaeta* species.

Штаммы: 1, GLS2^T (данные настоящего исследования); 2, *S. globosa* Buddy^T (Ritalahti *et al.*, 2012); 3, *S. pleomorpha* Grapes^T (Ritalahti *et al.*, 2012); 4, *S. coccoides* SPN1^T (Dröge *et al.*, 2006; Abt *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2014). Все штаммы не содержат каталазу, имеют грамотрицательный тип клеточной стенки, ассимилируют D-ксилозу.

Свойства	1	2	3	4
Морфология	Плеоморфные (сферические, овальные, кольцевидные, неправильные)	Кокки	Плеоморфные (сферические, удлиненные или в форме полумесяца)	Кокки
Подвижность	-	-	-	-
Температура, (°C):				
диапазон	20-40	20-37	15-30	15-40
оптимум	30-34	30	20-25	30
pH:				
диапазон	5.7-8.2	н.о.	н.о.	5.5-9.5
оптимум	6.8-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	7.4
Оптимум NaCl, г/л	1-1.5	1	1	1
Основные жирные кислоты	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:0} 3-OH; C _{16:0} DMA; C _{16:1} ; C _{16:1} DMA	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:1} ; C _{18:1} ; br-C _{17:1}	C _{14:0} ; C _{16:0} ; C _{16:1} ; br-C _{17:1}	*C _{14:0} ; C _{16:0} ; iso-C _{16:0}
Содержание Г+Ц пар в ДНК (mol%)	47.2	48.9	46.2	50.6
Цитохром-оксидаза	-	-	-	-
Источник выделения	' <i>M. gilichinskiia</i> ' JL01	Пресноводные отложения	Пресноводные отложения	Толстый кишечник термита <i>Neotermes castaneus</i>

*Данные из Miyazaki *et al.*, 2014; н.о. – не определяли

5.3.2. Влияние *S. associata* GLS2^T на рост и метаногенез ‘*M. gilichinskii*’ JL01^T

Мы проверили предположение о влиянии бактерии *S. associata* и ее клеточных экстрактов на рост и метаногенез чистых культур, как выделенных из многолетнемерзлых отложений, так и метаногенов, выделенных из наземных источников. Полученные результаты показали, что совместное культивирование штамма JL01^T и сахаролитической бактерии *S. associata* штамм GLS2^T на среде для метаногенных архей (метанол в качестве субстрата) приводило к значительному увеличению продукции метана и сокращению лаг-периода (Рисунок 20).

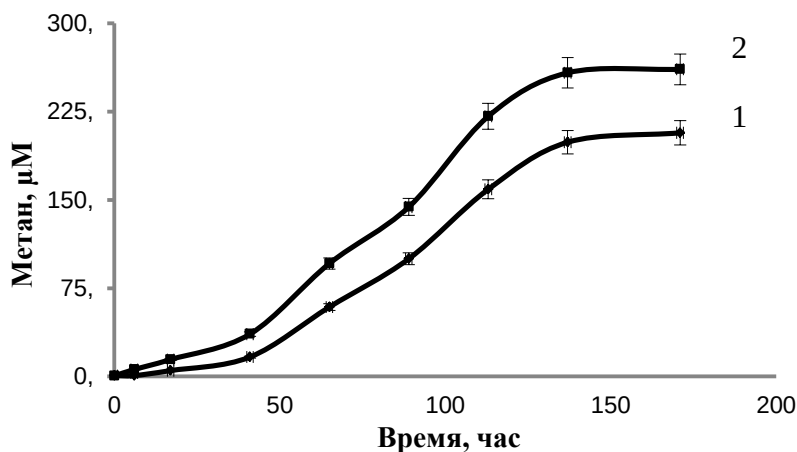


Рисунок 20. Образование метана штаммом JL01^T при росте на метаноле (1) и в присутствии *S. associata* штамм GLS2^T (2).

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

Нами было установлено, что физиологические диапазоны роста штамма GLS2^T и ‘*M. gilichinskii*’ JL01^T были одинаковыми. Этот факт наряду со

способностью штамма GLS2^T расти на компонентах клеточной стенки метаносарцины (метанохондроитина), таких как глюкоза и глюкуроновая кислота, а также его устойчивость к широкому кругу антибиотиков и его свойств дефицита клеточной стенки, характерных для многих патогенов, объясняют выбор и тесную ассоциацию как GLS2^T и 'M. gilichinskiia' JL01^T.

Увеличение скорости метаногенеза в таких совместных культурах может быть связано, например, с образованием сферохетой ацетата в процессе сбраживания компонентов клеточных стенок метаносарцины, который, в свою очередь, является субстратом для *Methanosarcina* spp. Метанобразующие археи, как известно, могут продуцировать предшественники витамина B₁₂ для других микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008). Ранее расшифрованный геном *S. globosa* Buddy^T (Caro-Quintero *et al.*, 2012) показывает, что эта бактерия не имеет полного набора генов для синтеза витамина B₁₂ и нуждается в его предшественниках. Таким образом, можно предположить, что 'M. gilichinskiia' JL01^T получает преимущество в экосистеме многолетнемерзлых отложений совместного сосуществования с бактериальным спутником, по физиологическим потребностям относящемуся к микроорганизмам – диссипотрофам.

5.4. Метанобразующие археи из мерзлоты – модельные организмы для астробиологии

Мерзлота является стабильной и сбалансированной окружающей средой, которая поддерживает жизнь намного дольше, чем любые другие известные места обитания. Она служит неким биогеохимическим барьером, который ограничивает проникновение поверхностных вод как внешнего фактора окружающей среды (Cameron *et al.*, 1974; Gilichinsky *et al.*, 2002), а возраст жизнеспособных изолятов указывает на то, что отложения пребывают в постоянно замороженном состоянии уже на протяжении от нескольких тысяч до нескольких миллионов лет. Поэтому вечная мерзлота на Земле считается аналогом возможных внеземных экосистем, где центральное место занимает Марс.

Впервые в мае 2008 года лабораторией Wet Chemistry (USA) был выполнен влажный химический анализ марсианского грунта, который характеризовался небольшой щелочностью и низкой концентрацией солей (Hecht *et al.*, 2009). В составе катионов присутствовали преимущественно Mg^{2+} и Na^+ , и в небольшом количестве K^+ и Ca^{2+} . К удивлению, были обнаружены перхлораты (0,6%) (ClO_4^-), вероятнее всего $Ca(ClO_4)_2$ или $Mg(ClO_4)_2$. Высокий восстановительный потенциал перхлората ($ClO_4^- / Cl^- E^0 = 1,287$ V) делает его идеальным акцептором электронов для микробного метаболизма. Однако, до сих пор среди архей известны только неметаногенные археи, которые восстанавливают перхлорат (Liebensteiner *et al.*, 2013; Oren *et al.*, 2014; Martínez-Espinosa *et al.*, 2015), и не ясно, являются ли эти соединения стрессорами для метаногенов.

5.4.1. Определение ингибирующих концентраций перхлоратов на рост метаногенных архей

В исследовании участвовали три штамма метаногенных архей *M. veterum* МК4^T, *M. arcticum* M2^T, и ‘*M. gilichinskii*’ штамм JL01^T, выделенные из многолетнемерзлых отложений различного возраста. Для сравнительных экспериментов были использованы штаммы *M. bryantii* М.о.Н^T и *M. masei* S6^T.

Для того, чтобы определить ингибирующее действие перхлоратов, в культуральные среды для метаногенов добавляли перхлораты в концентрациях до 10 мМ (согласно исследованиям, в экстрактах марсианского грунта максимально возможное содержание соли составляет именно 10 мМ (Hecht *et al.*, 2009)). Полученные результаты показали, что, внесение в питательную среду от 2,1 до 9,0 мМ $Mg(ClO_4)_2$ приводило к снижению продукции метана у всех метаногенных штаммов на 20%. Следует отметить, что *M. arcticum* M2^T был наиболее устойчив к действию этих солей. Что касается *M. bryantii* М.о.Н^T, добавление 9,0 мМ $Mg(ClO_4)_2$ и 9,8 мМ $NaClO_4$ снижало метанообразование данного штамма на 80%. Совместное добавление перхлоратов натрия и магния во всех случаях усиливало ингибирующий эффект. Концентрации, при которых эти соли ингибируют рост клеток (Таблица 14) соответствуют их активности как хаотропных стрессоров

(Cray *et al.*, 2015, Bhaganna *et al.*, 2010), которые разупорядочивают клеточные макромолекулы.

Таблица 14. Ингибирующее действие $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ и NaClO_4 на рост метаногенных архей различного происхождения

$\text{IC}_{20, \dots, 50}$ - концентрации перхлоратов, вызывающие 20, 50 и 80%-ное ингибирование метаногенеза

Штаммы	$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, mM			NaClO_4 , mM			$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2 + \text{NaClO}_4$, mM		
	IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{80}
<i>M. bryantii</i> , M.o.H ^T	3,5	6,2	9,0	2,8	6,0	9,8	2,2	4,0	8,1
<i>M. arcticum</i> , M2 ^T	9,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>M. veterum</i> MK4 ^T	2,6	6,6	>10,0	4,1	8,4	>10,0	2,5	5,6	9,0
<i>M. mazei</i> , S-6 ^T	5,0	9,2	>10,0	7,8	>10,0	>10,0	4,8	>10,0	>10,0
' <i>M. gilichinskii</i> ', JL01 ^T	2,1	5,2	>10,0	3,9	9,7	>10,0	1,8	4,8	>10,0

5.4.2. Образование метана в культуральной среде, содержащей перхлораты

Рост и метаногенез исследуемых метаногенных архей проверяли на среде с добавлением перхлоратов в концентрации 5 mM. Результаты показали крайне низкую продукцию биомассы и, как следствие, низкое содержание метана в газовой фазе. Исследование влияния перхлората магния и натрия на метаногенез водородпотребляющих метаногенов показало, что метаногены, выделенные из многолетнемерзлых отложений, оказались более устойчивы. Рост *M. bryantii* ингибировался в большей степени, чем рост *M. veterum* MK-4^T и *M. arcticum* M2^T. Штамм *M. arcticum* M2^T отличался лучшим ростом в присутствии перхлоратов, однако продукция метана штаммом снизилась на 20% по сравнению с контролем, не содержащим перхлораты (Рисунок 21).

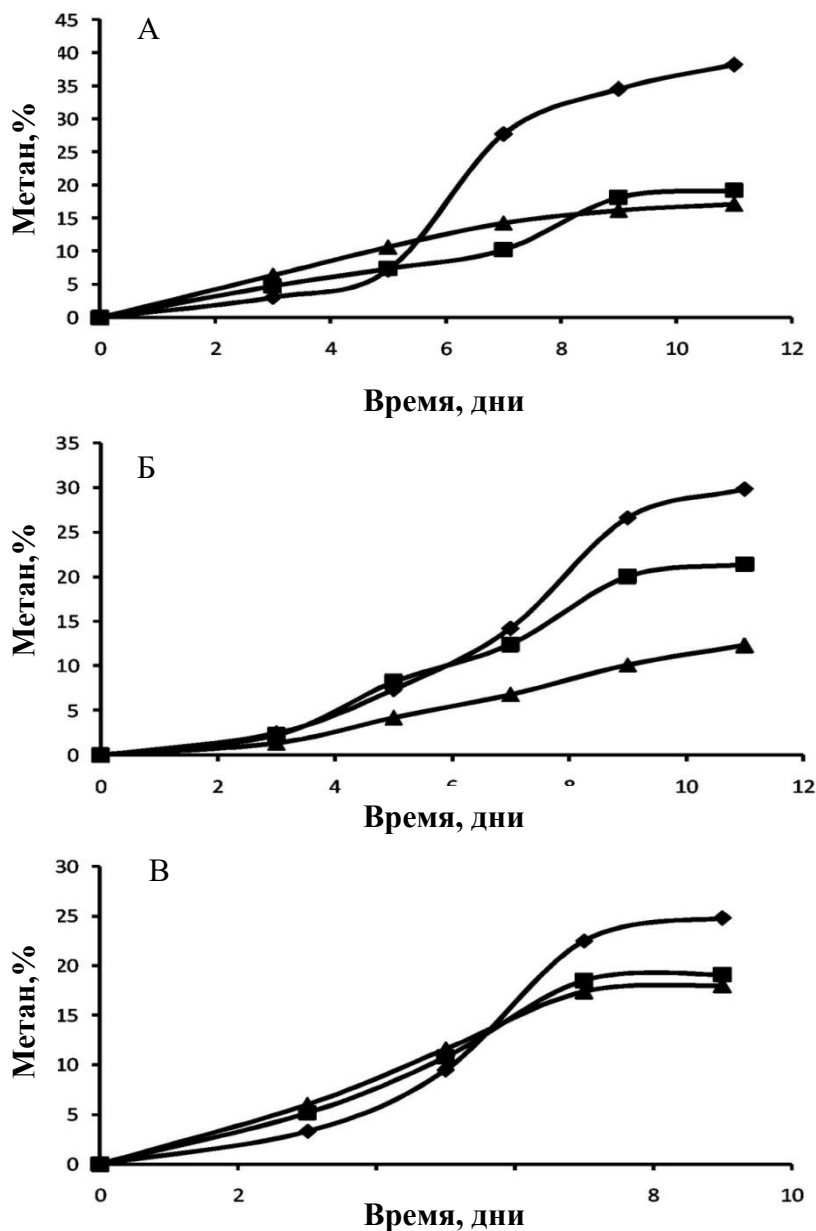


Рисунок 21. Образование метана водородпотребляющими штаммами *M. bryantii* М.о.Н^Т (А), *M. veterum* МК4^Т (Б) и *M. arcticum* М2^Т (В) на среде с NaClO₄ (квадрат), Mg(ClO₄)₂ (треугольник) и без перхлоратов (ромб).

Что касается *Methanosarcina* spp., присутствие в среде перхлоратов замедляло процесс роста в большей степени, кроме этого, у штамма JL01^Т наблюдалось удлинение лаг-фазы до девяти дней (Рисунок 22). Исключение составил штамм *Methanosarcina mazei* S-6^Т, рост которого на среде с перхлоратом натрия был выше, чем на обычной среде.

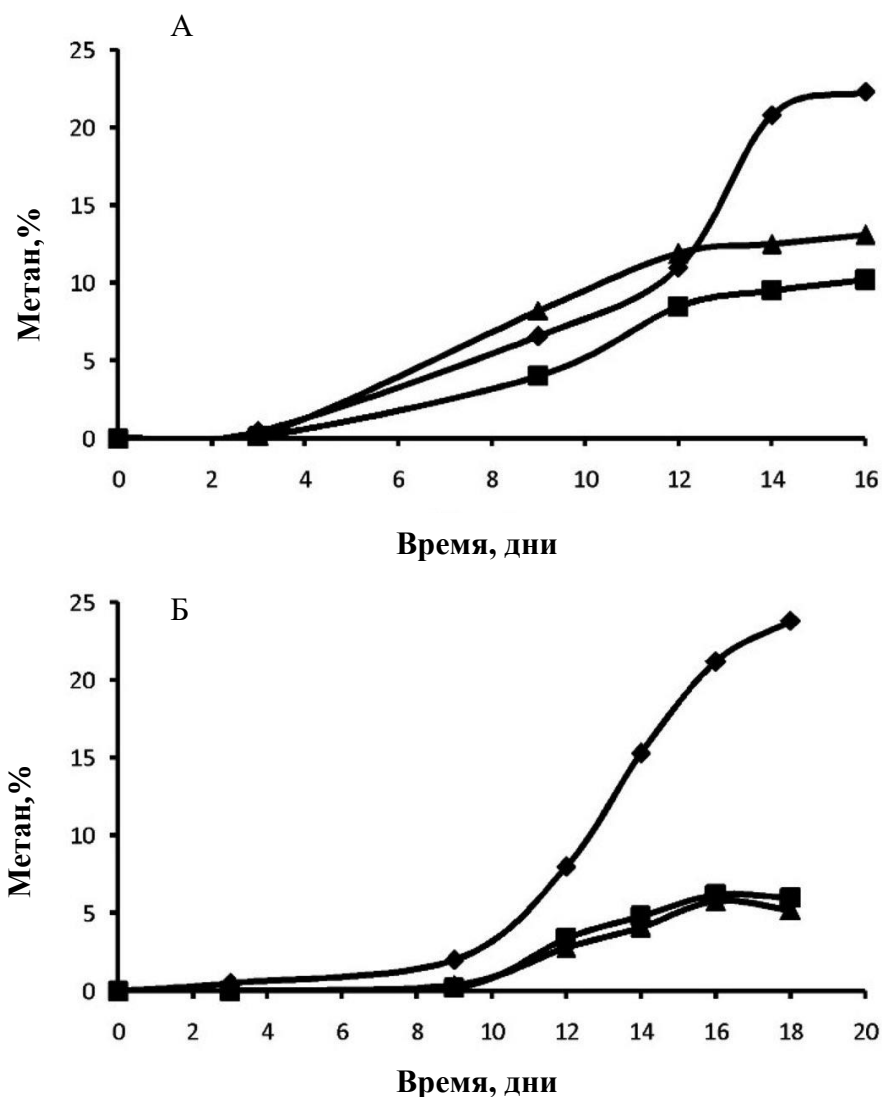


Рисунок 22. Образование метана ацетокластическими штаммами *M. masei* S6^T (А) и '*M. gilichinskii*' JL01^T (Б) на среде с NaClO₄ (квадрат), Mg(ClO₄)₂ (треугольник) и без перхлоратов (ромб).

Поскольку считается, что одним из основных условий для выживания на Марсе является галотолерантность, главными обсуждаемыми аналогами внеземных экосистем, в частности Марса, в первую очередь, являются гиперсоленые источники на Земле, особенно регионы многолетнемерзлых отложений (Rummel *et al.*, 2014).

Ранее, изучение микроорганизмов криопэгов Арктики показало, что большинство из них являются не галофильными, но галотолерантными

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

Исследованные метаногены не являются галофилами, но все штаммы растут в присутствии NaCl в среде в концентрациях до 0,3 М (Shcherbakova *et al.*, 2011). Но, в отличие от *M. bryantii* MoH^T и *M. veterum* MK4^T, которые лучше всего растут в пресной среде, *M. arcticum* M2^T рос с максимальной скоростью при концентрации NaCl 0,1 М. Возможно это различие в физиологии исследуемых метаногенов объясняет, почему реакция на стресс, в данном случае перхлоратов, отличается. Дальнейшие исследования прояснят, являются ли перхлораты и другие соли стрессорами или они действительно могут улучшать или ингибировать рост при некоторых температурах.

При исследовании результатов роста метаногенов в присутствии сильных окислителей возник другой вопрос, а именно, могут ли метаногены использовать ClO₄⁻ в качестве акцептора электронов при окислении метана, поскольку ранее было показано, что метаногенные археи родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum* и *Methanosarcina* могут образовывать и в то же время окислять метан. Зендером с соавторами (Zehnder *et al.*, 1979) было показано, что по сравнению с количеством образующегося метана, количество метана, одновременно окисленного изученными метаногенами, колебалось от 0,3% до 0,001%, в зависимости от штамма.

Для проверки данного предположения мы проследили за изменением концентрации перхлоратов в среде культивирования через девять дней роста

Methanobacterium spp. и шестнадцать дней для *Methanosarcina* spp. Следует отметить, что в случае *Methanosarcina* spp. снижение содержания перхлоратов было менее, чем 10% от общего количества, первоначально добавленного в среду, включая контроль.

Рисунок 23 иллюстрирует изменение концентрации перхлоратов во время культивирования *Methanobacterium* spp.

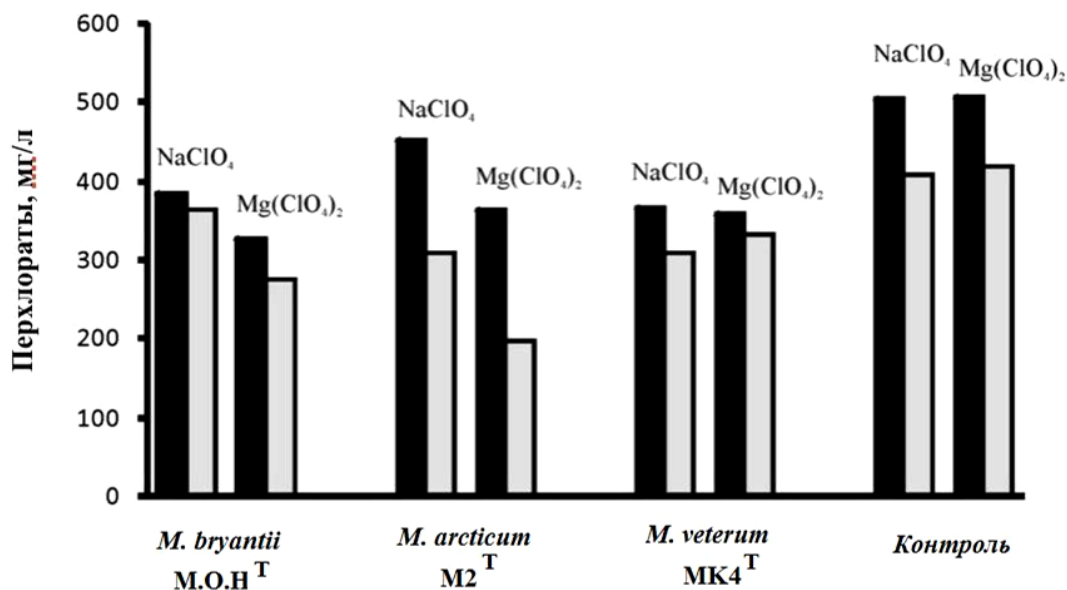


Рисунок 23. Содержание перхлоратов при культивировании водородпотребляющих метаногенов. Черные столбики - концентрация перхлоратов среде в начальной точке; серые столбики - концентрации перхлоратов через девять дней роста. В качестве контроля использовалась среда MB с перхлоратами.

Изменение содержания NaClO₄ (5,7-16,1%) у *M. bryantii* M.O.H^T и Mg(ClO₄)₂ (16,0-7,2%) у *M. veterum* MK4^T не превышало уменьшение концентрации перхлоратов в контроле (19,0 и 17,6%, соответственно). Однако у штамма *M. arcticum* M2^T содержание NaClO₄ в культуральной среде снизилось до 31,8%, а Mg(ClO₄)₂ - до 45,6%.

Таким образом, уменьшение концентрации перхлоратов в процессе роста штамма свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в

качестве акцептора электронов для окисления метана. Этот результат, несомненно, требует экспериментального подтверждения, но, тем не менее, он открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии для метаногенов, в том числе во внесемных условиях.

5.4.3. Влияние перхлоратов на морфологию клеток *M. arcticum* M2^T

Для выявления причины высокой устойчивости штамма *M. arcticum* M2^T к действию перхлоратов, было проведено микроскопическое исследование морфологии клеток, выращенных в среде с добавлением $Mg(ClO_4)_2$ как сильного окислителя. Как правило, клетки штамма представляют собой неподвижные, слегка изогнутые палочки (Рисунок 24, А) шириной 0,45-0,50 мкм и длиной 3,0-6,0 мкм, и часто образуют цепочки и нити длиной более 30 мкм. Ранее было показано, что при длительном хранении штамм *M. arcticum* M2^T образует цистоподобные кокковидные клетки (Shcherbakova *et al.*, 2011). При наличии перхлората образование цистоподобных клеток начиналось в логарифмической фазе роста (Рисунок 24, Б). Цитоплазма цистоподобных клеткок была более плотной, кроме того наблюдались дифференцированные поверхностные слои (Рисунок 24, В). Способность образовывать такие морфотипы отличает *M. arcticum* M2^T от других метаногенов, используемых в исследовании, и, вероятно, делает этот штамм, устойчивым к перхлоратам.

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

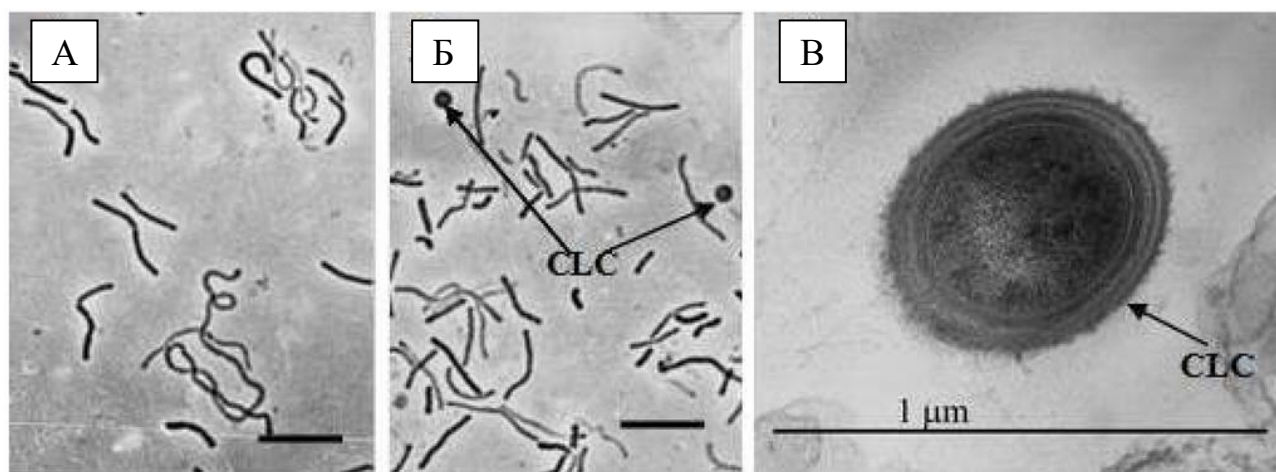


Рисунок 24. Микрофотографии штамма *M. arcticum* M2^T. Клетки без перхлората (А) и с $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ в среде (Б, В): А, Б - фазовый контраст, бар 10 мкм; В - ультратонкий срез. Условные обозначения: CLC-цистоподобная клетка.

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

5.5. Идентификация метаногенных архей с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии

Обычно для идентификации метаногенных архей, как и для других прокариот, применяется метод филогенетического анализа гена 16S рРНК, а также гена метил-СоМ-редуктазы (α -субъединицы, *mcrA*) – ключевого фермента метаногенеза. Однако данная группа архей включает облигатно анаэробных микроорганизмов, требующих использования анаэробной техники культивирования, что в значительной степени усложняет их идентификацию. Времяпролетная масс-спектрометрия с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ МС) широко используется в медицинской микробиологии (Clark et al., 2013). Этот быстрый и относительно

дешевый метод в настоящее время применяется в клинических лабораториях для идентификации патогенов, в том числе, бактерий (Xiao *et al.*, 2014; Bessede *et al.*, 2011; Alotoom *et al.*, 2011; Schulthess *et al.*, 2014; McElvania *et al.*, 2014; Hsueh *et al.*, 2014), грибов (Schulthess *et al.*, 2014; Vlek *et al.*, 2014; Pavlovic *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2014) и вирусов (Calderaro *et al.*, 2014). Применение этого способа диагностики для архей сдерживается отсутствием данных о белковых профилях этой группы прокариот. В литературе имеется лишь несколько сообщений об использовании МАЛДИ МС для идентификации архей, ассоциированных с человеческим организмом или выделенных из природных мест обитания. Крейдер и Эмерсон (Krader and Emerson, 2004) использовали МАЛДИ МС, чтобы идентифицировать 28 штаммов, представляющих четыре рода метаноархей и три рода галоархей, а также некоторые экстремофильные бактерии, обнаруживая компоненты клеточной стенки в пределах от 500 до 3000 Да. Однако галоархеи и большинство метаноархей не имеют клеточных стенок на основе муреина, и диапазон, полученный в исследовании, не может применяться для идентификации микроорганизмов, поскольку многие вторичные метаболиты также попадают в этот диапазон масс.

Методом МАЛДИ МС были исследованы 4 штамма метаногенов, ассоциированных с человеческим организмом, (*Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter oralis*, *Methanosphaera stadtmanae* и *Methanomassiliicoccus luminyensis*), что показало принципиальную возможность идентификации архей, населяющих кишечник человека (Dridi *et al.*, 2012). В другой работе были получены белковые профили 69 штаммов галофильных архей, в том числе 24 штаммов метаногенов. В выборку метаногенов входили 20 галофилов и негалофильные штаммы родов *Methanosarcina* (3 штамма) и *Methanobacterium* (1 штамм). Результатом данного исследования стало предположение о возможности использования некоторых белков в качестве родо-и видоспецифичных маркеров архей (Shih *et al.*, 2015)

Нами были исследованы чистые культуры 39 штаммов метанобразующих архей, относящихся к 24 видам родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*,

Methanosarcina, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* и *Methanotrix*, находящихся в фонде ВКМ. Для МАЛДИ масс-спектрометрического анализа использовались штаммы, выращенные в жидких питательных средах и находившиеся в поздней логарифмической фазе роста. В результате сравнения белковых профилей оказалось, что каждый штамм характеризуется уникальными белковыми профилями. В качестве примера на Рисунке 25 представлены белковые профили 3 штаммов, относящихся к роду *Methanosarcina*, которые свидетельствуют об отличиях, как среди низкомолекулярных, так и среди высокомолекулярных пиков, что свидетельствует о принадлежности исследуемых метаногенов к разным видам этого рода.

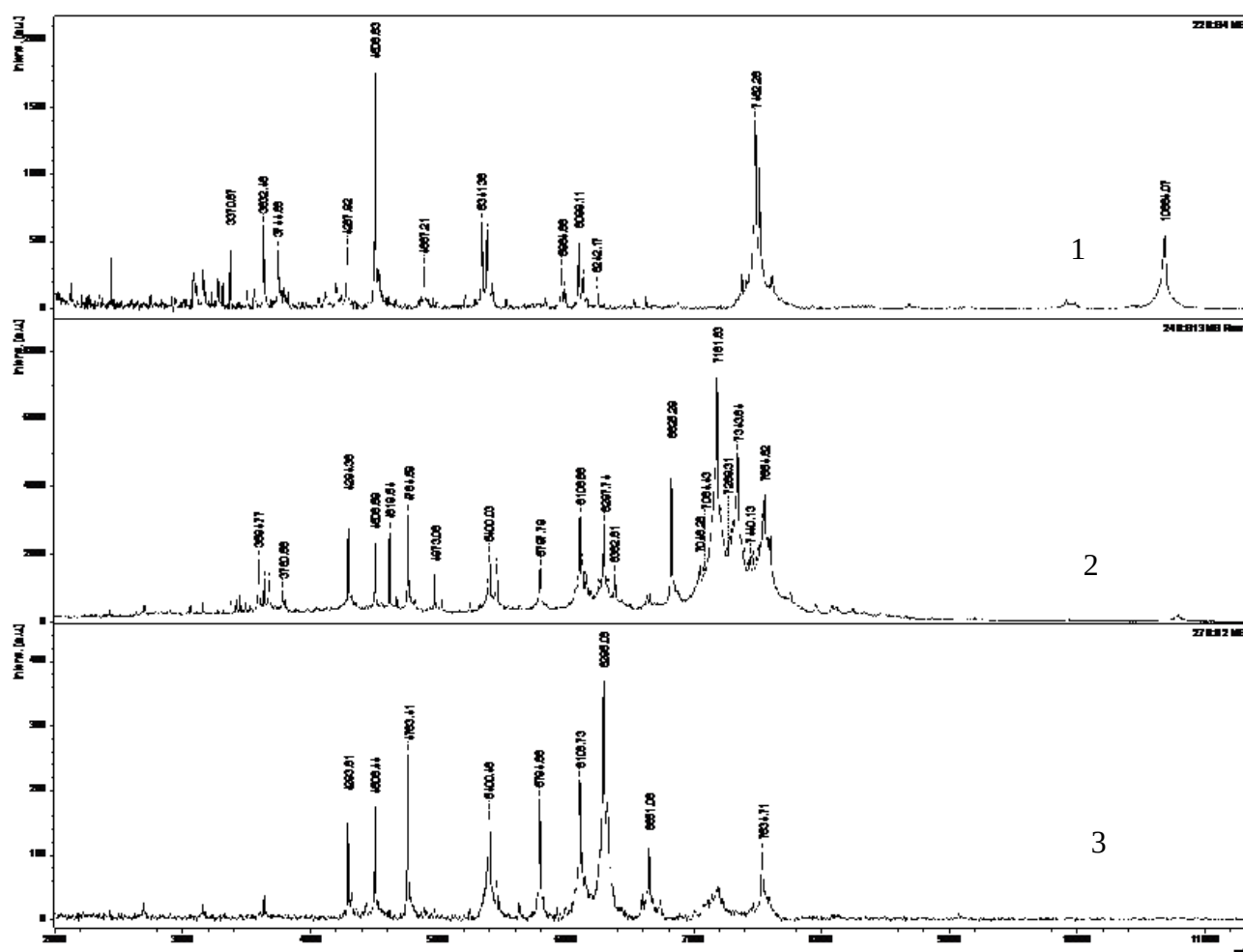


Рисунок 25. Примеры масс-спектров белковых профилей представителей рода *Methanosarcina*: 1 – *M. mazei* S-6^T; 2 – *Methanosarcina* sp. Pr-I; 3 – *M. lacustre* ZS^T.

Изучение белковых масс-спектров палочковидных H_2 -потребляющих метаногенов показало, что они также уникальны для каждого штамма, но существуют белки, характерные для родов *Methanobacterium* и *Methanospirillum* (Рисунок 26).

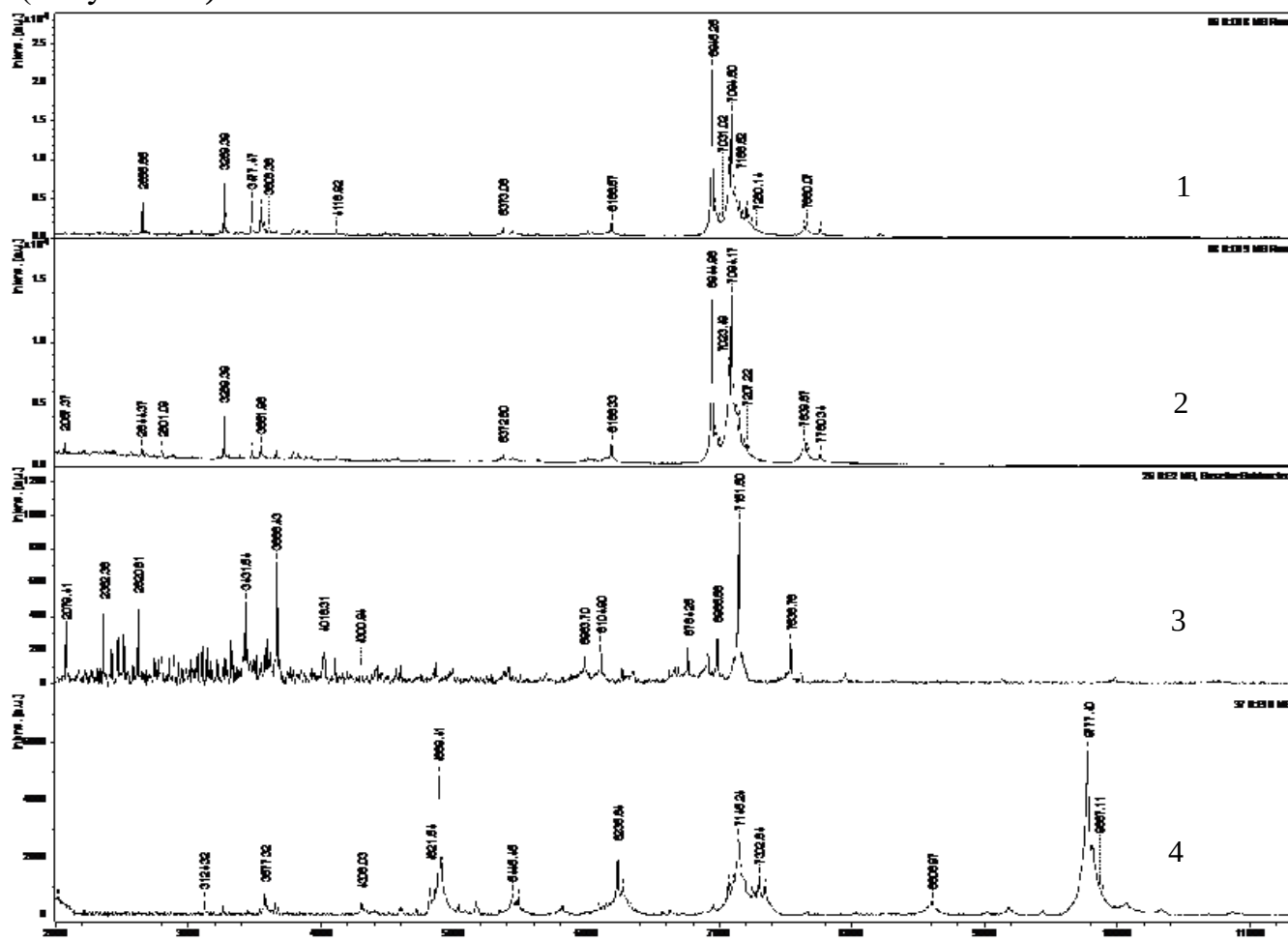


Рисунок 26. Примеры масс-спектров белковых профилей штаммов родов *Methanobacterium* и *Methanospirillum*: 1- *M. veterum* МК-4^T; 2 - *M. bryantii* МоН^T; 3 - *M. lacunae* Ki8-1^T, 4 - *Methanobacterium* sp. VKM B-1960.

Анализ полученных белковых профилей позволил установить таксономическое положение некоторых метанобразующих штаммов, хранящихся в ВКМ без проведения ПЦР и последующего секвенирования гена 16S рРНК. Так, штамм VKM B-2199, ранее отнесенный к виду *Methanobacterium formicicum*, по данным МАЛДИ образует единый кластер с тремя видами рода *Methanospirillum*, а штаммы Z-245, Z-1901 и *Methanobacterium* sp. F-1 относятся к роду *Methanothermobacter* и, вероятно, представляют собой новые виды этого рода (Рисунок 27).

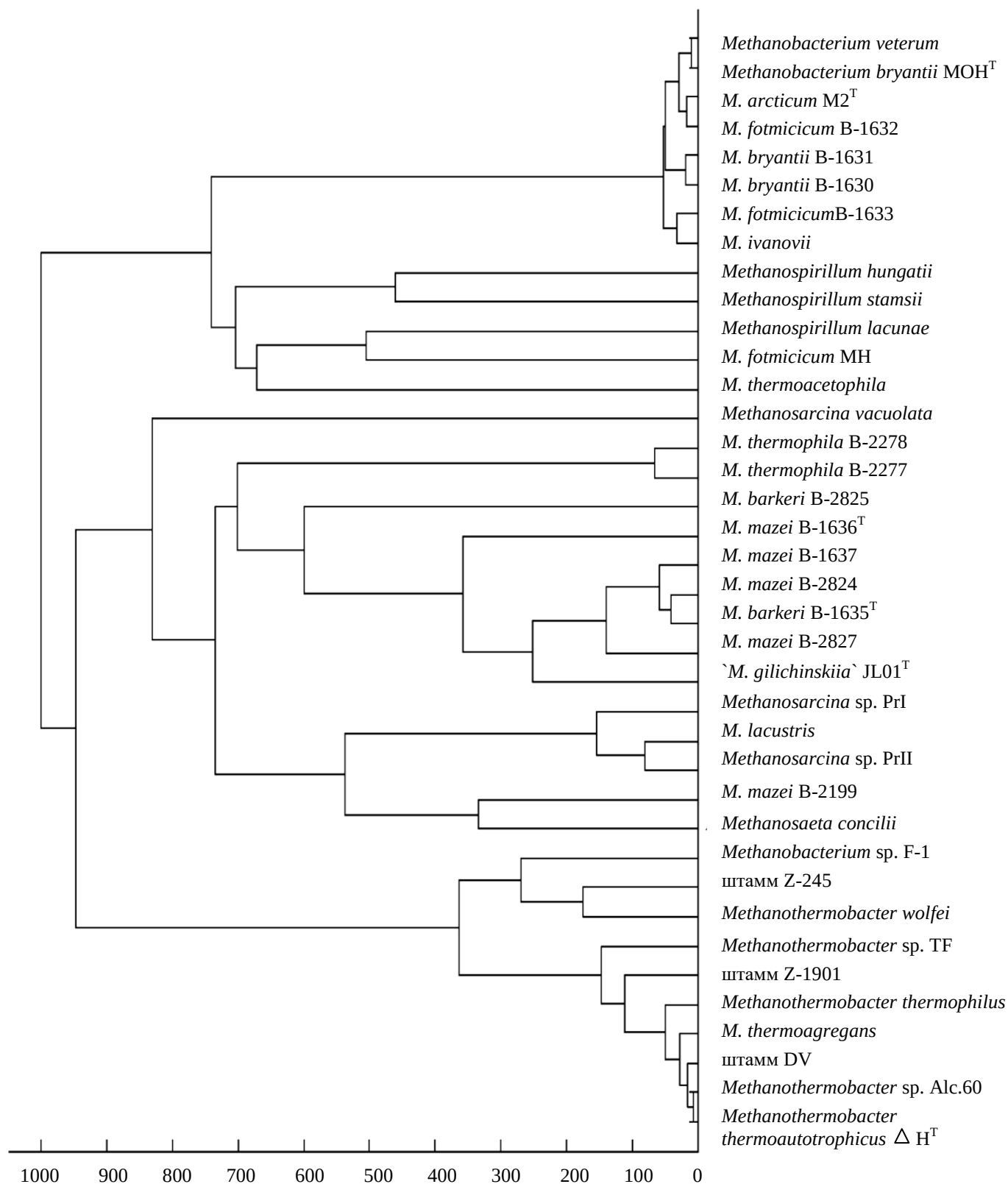


Рисунок 27. Дендрограмма МАЛДИ масс-спектров штаммов родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanotrix* и *Methanosaeta*. По шкале снизу – уровень расхождения, справа по шкале – исследуемые штаммы.

По данным МАЛДИ *Methanobacterium thermoagregans* VKM В-1959^T оказался очень близок к типовому штамму *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔН^T (Рисунок 27). Секвенирование нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показало 99,92% сходства, что говорит о том, что эти микроорганизмы являются представителями одного вида (Рисунок 28).

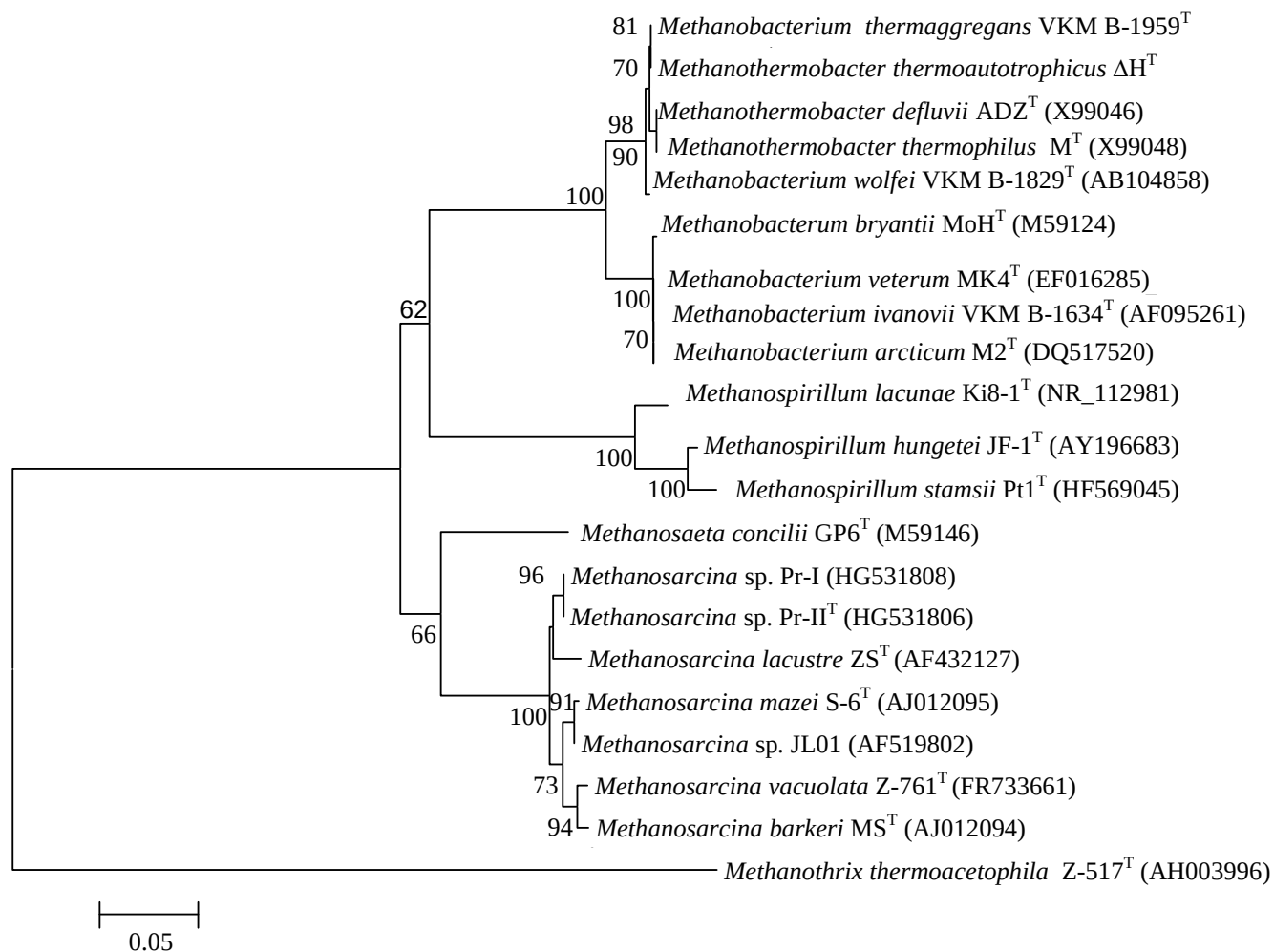


Рисунок 28. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа генов 16S рРНК, показывающее положение штаммов метаногенных архей близкородственных видов родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* и *Methanotrix*. Степень ветвления была получена методом «neighbor-joining». В скобках указаны номера последовательностей в GenBank.

Среди исследованных метаноархей лишь для *M. thermoautotrophicus* ΔH^T VKM B-1908^T и *Methanosarcina mazei* S-6^T, VKM B- 1635^T секвенированы полные геномы (AE000666 и CP009512, соответственно), которые доступны для идентификации специфических сигналов в МАЛДИ спектрах. Информация о массах белков, которые могут использоваться в качестве идентификационных маркеров, была получена с помощью программного обеспечения TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>). Это программное обеспечение идентифицирует белки на основе экспериментальных масс, полученных масс-спектрометрией MALDI, с использованием информации, доступной в базах данных последовательности белка UniProtKB / Swiss-Prot и UniProtKB / TrEMBL. Как видно из Таблицы 15, биомаркерами для идентификации рода *Methanothermobacter* могут служить ДНК-связывающий белок с предсказанной массой 7143 Да и 30S рибосомальный белок S17e с предсказанной массой 7199 Да.

Наши исследования показали, что биомаркером для вида *Methanosarcina mazei* может служить специфический сигнал 10680-10687 Да, вероятно, соответствующий 50S рибосомальному белку L31e с предсказанной массой 10680 Да. Кроме того, у исследованных метаногенных штаммов обнаружены специфичные для каждого рода сигналы: 5444-5445 Да для *Methanothermobacter* spp., 6944-6946 и 7094-7096 Да – для *Methanobacterium* spp.; 7480-7482 Да - для *Methanosarcina* spp. Дальнейший анализ и сравнение с белками из геномных данных позволит убедиться в значении этих белков для идентификации метаногенов на уровне вида и рода.

МАЛДИ масс-спектрометрия имеет некоторые ограничения, такие как, наличие высокого сходства белковых профилей внутри некоторых групп микроорганизмов, а также отсутствие в коммерческих базах данных белковых профилей метаногенов, но, тем не менее, сравнение полученных данных с данными филогенетического анализа используемых в исследовании штаммов (Рисунок 25) показывает принципиальную возможность экспресс-определения

новых представителей метанобразующих архей с использованием этого метода с точностью до вида.

Таблица 15. Биомаркерные белки рода *Methanothermobacter* по данным МАЛДИ и генома *M. thermoautotrophicus* ΔH^T VKM B-1908^T.

Штаммы	UniPort ID	Предсказанная масса, Да	Наблюдаемая масса (Да)/ Интенсивность, %	Описание белка
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> ΔH^T VKM B-1908 ^T	-	-	5445/23	-
	-	-	6235/24	-
	O27731	7143	7144/97	ДНК-связывающий белок HMt-1.2
	P50483	7152	7152/100*	ДНК-связывающий белок HMt-1.1.
	O26894	7199	7192/62	30S рибосомальный белок S17e.
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> VKM B-1959	-	-	5445/12	-
	-	-	6235/21	-
	-	-	7146/89	-
	-	-	7152/100	-
	-	-	7193/52	-
<i>Methanothermobacter</i> sp. VKM B-1958	-	-	5445/14	-
	-	-	6235/11	-
	-	-	7144/72	-
	-	-	7152/100	-
	-	-	7192/54	-
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> DV, VKM B-1851	-	-	5444/5	-
	-	-	6235/13	-
	-	-	7143/74	-
	-	-	7151/100	-
	-	-	7190/48	-
<i>Methanothermobacter thermophilus</i> M ^T VKM B-1786 ^T	-	-	6235/10	-
	-	-	7145/84	-
	-	-	7153/100	-
	-	-	7192/65	-
<i>Methanothermobacter</i> sp. F-1, VKM B-1852	-	-	5444/4	-
	-	-	7154/100	-
	-	-	7194/81	-

*жирным выделены сигналы, встречающиеся у всех исследованных штаммов *Methanothermobacter* spp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. Обнаруженные метаногены относились к порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*.

Проведенные исследования показали, что в изучаемых образцах по мере увеличения глубины наблюдалось увеличение метаногенного разнообразия, что, вероятно, связано с преобладанием анаэробных условий в нижних горизонтах. Кроме того, возможно, что в более глубоких горизонтах ММО содержатся органические соединения, доступные для метаногенов (ацетат, метиламины или водород). Еще одно объяснение более разнообразного представительства метаногенов и архей заключается в том, что процесс отжата метана во время промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться миграцией микробных клеток за фронтом промерзания.

Дополнительным аргументом в пользу биогенного происхождения метана и сохранения жизнеспособности метаногенных архей в ММО в течение геологического периода времени стало выделение в чистую культуру нового вида психроактивной метаносарцины '*Methanosarcina gilichinskiia*' JL01^T и ее бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2^T из голоценовых отложений Арктики. Полученные данные о биологических свойствах этих штаммов позволили высказать гипотезу о важном значении тесной ассоциации архей и бактерий в метаногенных сообществах многолетнемерзлых отложений, характеризующихся низким содержанием органических веществ.

Исследовано влияние перхлоратов, как одного из компонентов грунта Марса, на рост метаногенных архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что *M. arcticum* штамм M2^T, выделенный из мерзлоты, оказался более устойчивым к действию окислителей. Обнаружено, что в процессе роста этого штамма происходило уменьшение

концентрации перхлоратов, что свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Это, в свою очередь, открывает новые возможности для изучения необычных способов получения энергии для метаногенов, в том числе во внеземных условиях.

До начала наших исследований в коммерческих базах данных почти полностью отсутствовали данные о белковых профилях целых клеток метаногенов. Нами проведен МАЛДИ масс-спектрометрический анализ метанобразующих архей фонда ВКМ. Не смотря на то, что данный метод имеет некоторые ограничения, сравнение полученных данных с данными филогенетического анализа исследованных штаммов показывает принципиальную возможность экспресс-определения новых метаногенных архей методом МАЛДИ масс-спектрометрии с точностью до вида.

Дальнейшее изучение биологических особенностей описанных микроорганизмов, а также расшифровка, анализ и сравнение уже полученных геномов позволит оценить механизмы их адаптации к соответствующим условиям среды и способы выживания в низкоэнергетических средах, которыми являются толщи вечной мерзлоты.

ВЫВОДЫ:

1. В образцах многолетнемерзлых отложений Арктики установлено широкое распространение некультивируемых архей, принадлежащих филумам *Euryarchaeota* и *Bathyarchaeota*, а в трех наиболее глубоких образцах детектированы представители *Woesearchaeota*. Обнаруженные последовательности генов 16S рРНК и *mrcA* метаногенных архей относились к порядкам *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* и *Methanocellales*.
2. Показано, что бинарная метаногенная культура, ранее полученная путем длительной инкубации голоценовых многолетнемерзлых отложений при 15°C, состояла из метаногенной археи штамм JL01^T (= VKM B-2370^T) и сахаролитической бактерии штамм GLS2^T (= VKM B-2742^T), представляющих новые виды *Methanosarcina gilichinskiia* sp. nov. и *Sphaerochaeta associata* sp.nov., соответственно.
3. Установлено, что совместное культивирование '*M. gilichinskiia*' JL01^T и *S. associata* GLS2^T на минеральной среде для метаногенных архей приводило к увеличению продукции метана приблизительно на 25%.
4. Исследование влияния перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост метаногенов различного происхождения показало, что водородпотребляющий метаноген *Methanobacterium arcticum* M2^T (= VKM B-2372^T), выделенный из многолетнемерзлых отложений, устойчив к действию перхлоратов, что может быть связано со способностью образовывать цистоподобные клетки.
5. Методом времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии определены белковые профили клеток метанобразующих архей фонда ВКМ, отсутствующие ранее в коммерческих базах данных. Анализ полученных результатов и их сравнение с геномными данными позволил выявить массы белков, которые могут использоваться в качестве маркеров для идентификации метаногенов рода *Methanobacterium* и *Methanosarcina*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ТЕМ - трансмиссионная электронная микроскопия

АОМ - анаэробное окисление метана

ВКМ – Всероссийская Коллекция Микроорганизмов

МАЛДИ (MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, TOF – *Time of Flight*) -Времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

МС – масс-спектрометрия

ANME – анаэробные метаногенные археи

ОТЕ – операционная таксономическая единица

SDS – додецил сульфат натрия

ЦТАБ - цетилтриметиламмонийбромид

п.о. – пар оснований

OD – оптическая плотность

ММО – многолетнемерзлые отложения

дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

FISH – fluorescent in situ hybridization

тыс. – тысяча

млн. - миллион

нм – нанометр

кл/г – клеток в грамме

мл - миллилитр

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Гиличинский Д.А., Хлебникова Г.М., Звягинцев Д.Г.** Микробиологические характеристики при изучении осадочных пород криолитозоны // Изв. АН СССР, Сер. геолог. - 1989. - Т. 6. - С. 103-115.
2. **Гиличинский Д. А.** Криобиосфера позднего кайнозоя: вечная мерзлота как среда сохранения жизнеспособных микроорганизмов : дис. – Тюмень, 2002.
3. **Калюжный С. В., Данилович Д. А., Ножевникова А. Н.** Анаэробная биологическая очистка сточных вод // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. – 1991. – Т. 29. – С. 156.
4. **Ленгелер Й., Дреус Г. В., Шлегель Г.** (ред.). Современная микробиология: Прокариоты: В 2-х томах: Пер. с англ. // Мир. - 2005.- Т.1. – С. 190-205.
5. **Хлебникова Г.М., Гиличинский Д.А., Фёдоров-Давыдов Д.Г, Воробьева Е.А.** Количественное определение микроорганизмов в вечномерзлых отложениях и погребенных почвах // Микробиология. - 1990. – Т. 59. - С. 148-155.
6. **Фотиев С.М.** Гидрохимический метод оценки палеотемпературы пород на Арктическом побережье // Криосфера Земли. - 1997. - Т.1. - С. 29-35.
7. **Фотиев С.М.** Криогенный метаморфизм пород и подземных вод // Академическое издательство «ГЕО». - 2009. - С. 277.
8. **Abt B., Han C., Scheuner C., Lu M., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Hammon N., Deshpande S., Cheng J.-F., Tapia R., Goodwin L.A., Pitluck S., Liolios K., Pagani I., Ivanova N., Mavromatis K., Mikhailova N., Huntemann M., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Brambilla E.-M., Rohde M., Spring S., Gronow S., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Detter J.C.** Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccoides* type strain (SPN1T), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccoides* comb. nov. and emendations of the family Spirochaetaceae and the genus *Sphaerochata* // Standards in Genomic Sciences. - 2012. - V. 6. – №2. - P. 194-209.

9. **Alatoom A.A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar J., Patel R.** Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry// *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. - V. 49. - № 8. - P. 2868-2873.
10. **Altheide T.S., Kral T.A.** Low-Pressure Desiccation Effects On Methane Production By Methanogens. // *Lunar and Planetary Science Conference*. - 2008. - P. 3-4.
11. **Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiological Reviews*. - 1995. -V. 59. - №1. - P. 143-169.
12. **Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., Amann R.I., Ludwig W.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation // *Microbiological Reviews*. - 1995. - V. 59. - №1. - P. 143-169.
13. **Auguet J.-C., Barberan A., Casamayor E.O.** Global ecological patterns in uncultured Archaea // *International Society for Microbial Ecology*. – 2010. -V. 4. - № 2. - P. 182.
14. **Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Weightman A.J.** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies // *Applied and environmental microbiology*. – 2005. – V. 71. – №12. – P. 7724-7736.
15. **Bakermans, C., Tsapin, A. I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D. A., Nealson, K.** Reproduction and metabolism at – 10 °C of bacteria isolated from Siberian permafrost // *Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 5. – №4. – P. 321-326.
16. **Bakermans, C., Ayala-del-Río, H. L., Ponder, M. A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. F., Tiedje, J. M.** *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost //

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V. 56. – №6. – P. 1285-1291.
17. **Bai, Y., Yang, D., Wang, J., Xu, S., Wang, X., An, L.** Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan Mountains, northwestern China // Research in Microbiology. – 2006. – V. 157. – №8. – P. 741-751.
 18. **Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R., Wolfe R.S.** Methanogens: reevaluation of a unique biological group // Microbiological Reviews. - 1979. –V. 43. - №2. -P. 260-296.
 19. **Barker H.A.** Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacterium Omelianskii* // Antonie van Leeuwenhoek. - 1939. -V. 6. - №1. - P. 201-220.
 20. **Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R.** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1996. - V.93. - №17. - P. 9188-9193.
 21. **Beam J.P., Jay Z.J., Kozubal M.A., Inskeep W.P.** Niche specialization of novel Thaumarchaeota to oxic and hypoxic acidic geothermal springs of Yellowstone National Park // International Society for Microbial Ecology. – 2014. -V. 8. - №4. - P. 938.
 22. **Beam J.P., Jay Z.J., Schmid M.C., Rusch D.B., Romine M.F., de M Jennings R., Kozubal M.A., Tringe S.G., Wagner M., Inskeep W.P.** Ecophysiology of an uncultivated lineage of *Aigarchaeota* from an oxic, hot spring filamentous 'streamer' community // International Society for Microbial Ecology. – 2016. -V. 10. - №1. - P. 210.
 23. **Belay N., Boopathy R., Voskuilen G.** Anaerobic transformation of furfural by *Methanococcus deltae* ΔLH // Applied and Environmental Microbiology. - 1997. - V. 63. - №5. - P. 2092-2094.
 24. **Bessede E., Angla-Gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Ménard A., & Mégraud F.** Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the

- routine of a University hospital // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2011. -V. 17. - №4. - P. 533-538.
25. **Bhaganna P., Volkers R.J.M., Bell A.N.W., Kluge K., Timson D.J., McGrath J.W., Ruijsenaars H.J., Hallsworth J.E.** Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells // *Microbial Biotechnology*. - 2010. - V. 3. - №6. - P. 701-716.
 26. **Blake, L. I., Tveit, A., Øvreås, L., Head, I. M., & Gray, N. D.** Response of methanogens in Arctic sediments to temperature and methanogenic substrate availability // *PloS One*. – 2015. – V. 10. – №6. – P. e0129733.
 27. **Borrel G., Adam P.S., Gribaldo S.** Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association // *Genome Biology and Evolution*. - 2016. - V. 8. - №6. - P. 1706-1711.
 28. **Boyd W. L., Boyd J. W.** The presence of bacteria in permafrost of the Alaskan Arctic // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1964. – V. 10. – №6. – P. 917-919.
 29. **Biswas S., Rolain J.M.** Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture // *Journal of Microbiological Methods*. - 2013. - V. 92. - №1. - P. 14-24.
 30. **Boone D.R.** Replacement of the Type Strain of *Methanobacterium formicicum* and Reinstatement of *Methanobacterium bryantii* sp. nov. nom. rev. (ex Balch and Wolfe, 1981) with M.o.H. (DSM 863) as the Type Strain // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1987. - V. 37. - №2. - P. 172-173.
 31. **Boone D.R., Whitman W.B.** Proposal of Minimal Standards for Describing New Taxa of Methanogenic Bacteria // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1988. - V. 38. - №2. - P. 212-219.
 32. **Boone D. R., Whitman W. B., Rouvière P.** Diversity and taxonomy of methanogens // *Methanogenesis*. – Springer US, 1993. – P. 35-80.
 33. **Boopathy R.** Transformation of nitroaromatic compounds by a methanogenic bacterium, *Methanococcus* sp. (strain B) // *Archives of Microbiology*. - 1994. -V. 162. - №3. - P. 167-172.

34. **Borrel G., Colombet J., Robin A., Lehours A.-C., Prangishvili D., Sime-
Ngando T.** Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark
permanently anoxic freshwater habitat // International Society for Microbial
Ecology. - 2012. - V.6. - №11. - P. 2119-2127.
35. **Boston P.J., Ivanov M.V., P. McKay C.** On the possibility of chemosynthetic
ecosystems in subsurface habitats on Mars // Icarus. - 1992. - V. 95. - №2. - P. 300-
308.
36. **Boynton W.V.** Distribution of Hydrogen in the Near Surface of Mars: Evidence
for Subsurface Ice Deposits // Science. - 2002. - V. 297. - №5578. - P. 81-85.
37. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical
Biochemistry. – 1976. – V. 72. – №1-2. – P. 248-254.
38. **Bräuer S.L., Cadillo-Quiroz H., Yashiro E., Yavitt J.B., Zinder S.H.** Isolation
of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog // Nature. - 2006. - V.
442. - №7099. - P. 192-194.
39. **Brochier-Armanet C., Forterre P., Gribaldo S.** Phylogeny and evolution of the
Archaea: one hundred genomes later // Current Opinion in Microbiology. - 2011. -
V. 14. - №3. - P. 274-281.
40. **Brochier-Armanet C.I., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P.** Mesophilic
Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota // Nature
Reviews Microbiology. - 2008. -V. 6. - №3. - P. 245-252.
41. **Brown J., Masuchi Y., Robb F., Doolittle W.** Evolutionary relationships of
bacterial and archaeal glutamine synthetase genes // Journal of Molecular Evolution.
- 1994. -V. 38. - №6. - P. 566-576.
42. **Bryant M.P., Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S.** *Methanobacillus omelianskii*,
a symbiotic association of two species of bacteria // Archiv fur Mikrobiologie. -
1967. - V.59. - №1. - P. 20-31.
43. **Bryant P., Campbell L.L., Crabill M.R.** Growth of *Desulfovibrio* in Lactate //
Applied and Environmental Microbiology. - 1977. - V. 33. - №5. - P. 1162-1169.

44. **Buck J.D.** Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1982. – V. 44. – №4. – P. 992-993.
45. **Calderaro A., Arcangeletti M.-C., Rodighiero I., Buttrini M., Gorrini C., Motta F., Germini D., Medici M.-C., Chezzi C., De Conto F.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification // *Scientific Reports*. - 2014. - V.4.
46. **Cameron R. E., Morelli F. A.** Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor Valley drill core // *Antarctic Journal of the United States*. – 1974. – P. 9. – №4. – P. 113-116.
47. **Caro-Quintero A., Ritalahti K.M., Cusick K.D., Löffler F.E., Konstantinidis K.T.** The chimeric genome of sphaerochaeta: Nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology // *mBio*. - 2012. - V.3. - №3. - P. e00025-12.
48. **Carpenter E. J., Lin S., Capone D. G.** Bacterial activity in South Pole snow // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – №. 10. – P. 4514-4517.
49. **Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C., Hug L.A., Brown C.T., Wilkins M.J., Frischkorn K.R., Tringe S.G., Singh A., Markillie L.M., Taylor R.C., Williams K.H., Banfield J.F.** Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // *Current Biology*. - 2015. -V. 25. - №6. - P. 690-701.
50. **Chao Q.-T., Lee T.-F., Teng S.-H., Peng L.-Y., Chen P.-H., Teng L.-J., Hsueh P.-R.** Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts // *PloS One*. – 2014. -V. 9. - №10. - P. e109376.
51. **Chao A.** Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability // *Biometrics*. – 1987. – P. 783-791.

52. **Chastain B.K., Kral T.A.** Zero-valent iron on Mars: An alternative energy source for methanogens // *Icarus*. - 2010. - V. 208. - №1. - P. 198-201.
53. **Chatton E.** Titres et travaux scientifiques (1906-1937) de Edouard Chatton. In: (eds). Impr. E. Sottano, 1938.
54. **Chen J., Wang F., Zheng Y., Jiang L., Xiao X.** Investigation of the methanogen-related archaeal population structure in shallow sediments of the Pearl River Estuary, Southern China // *Journal of Basic Microbiology*. - 2014. - V. 54. - №6. - P. 482-490.
55. **Chen, Z., Yu, H., Li, L., Hu, S., & Dong, X.** The genome and transcriptome of a newly described psychrophilic archaeon, *Methanolobus psychrophilus* R15, reveal its cold adaptive characteristics // *Environmental Microbiology Reports*. – 2012. – V. 4. – №6. – P. 633-641.
56. **Chong S.C., Liu Y., Cummins M., Valentine D.L., Boone D.R.** *Methanogenium marinum* sp. nov., a H₂-using methanogen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2002. – V. 81. – №1. – P. 263-270.
57. **Christner B. C.** Incorporation of DNA and Protein Precursors into Macromolecules by Bacteria at– 15°C // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – №. 12. – P. 6435-6438.
58. **Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // *Clinical Microbiology Reviews*. –V. 26. - №3. - P. 547-603.
59. **Cole J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Titus Brown C., Porras-Alfaro A., Kuske C., Tiedje J.M.** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis // *Nucleic acids research*. – 2013. – V. 42. – №D1. – P. D633-D642.
60. **Colwell F.S., Boyd S., Delwiche M.E., Reed D.W., Phelps T.J., Newby D.T.** Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2008. -V.74. - №11. - P. 3444-3452.

61. **Corradi, C., Kolle, O., Walter, K., Zimov, S. A., & Schulze, E. D.** Carbon dioxide and methane exchange of a north-east Siberian tussock tundra // *Global Change Biology*. – 2005. – V. 11. – №11. – P. 1910-1925.
62. **Costa K. C., Leigh J. A.** Metabolic versatility in methanogens // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – V. 29. – P. 70-75.
63. **Cowan D.A., Russell N., Mamais A., Sheppard D.M.** Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass // *Extremophiles*. - 2002. - V. 6. - №5. - P. 431–436.
64. **Cray J.A., Stevenson A., Ball P., Bankar S.B., Eleutherio E.C.A., Ezeji T.C., Singhal R.S., Thevelein J.M., Timson D.J., Hallsworth J.E.** Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms // *Current Opinion in Biotechnology*. - 2015. - V. 33. - P. 228-259.
65. **Cui M., Ma A., Qi H., Zhuang X., Zhuang G.** Anaerobic oxidation of methane: an "active" microbial process // *MicrobiologyOpen*. - 2015. - V.4. - №1. - P. 1-11.
66. **Cull S.C., Arvidson R.E., Catalano J.G., Ming D.W., Morris R.V., Mellon M.T., Lemmon M.** Concentrated perchlorate at the Mars Phoenix landing site: Evidence for thin film liquid water on Mars // *Geophysical Research Letters*. - 2010. - V. 37. - P. 1-6.
67. **Demidov N.E., Boynton W.V., Gilichinsky D.A., Zuber M.T., Kozyrev A.S., Litvak M.L., Mitrofanov I.G., Sanin A.B., Saunders R.S., Smith D.E., Tretyakov V.I., Hamara D.** Water distribution in Martian permafrost regions from joint analysis of HEND (Mars Odyssey) and MOLA (Mars Global Surveyor) data // *Astronomy Letters*. - 2008. - V. 34. - №10. - P. 713-723.
68. **Di Giulio M.** Formal proof that the split genes of tRNAs of *Nanoarchaeum equitans* are an ancestral character // *Journal of Molecular Evolution*. - 2009. - V. 69. - №5. - P. 505.
69. **Ding X., Yang W.J., Min H., Peng X.T., Zhou H.Y., Lu Z.M.** Isolation and characterization of a new strain of *Methanothermobacter marburgensis* DX01 from hot springs in China // *Anaerobe*. - 2010. - V. 16. - №1. - P. 54-59.

70. **Dong X., Cheng G., Stams A.J.M.** Butyrate oxidation by *Syntrophospora bryantii* in co-culture with different methanogens and in pure culture with pentenoate as electron acceptor // *Applied Microbiology and Biotechnology*. -1994. - V. 42. - №4. - P. 647-652.
71. **Droge S., Frohlich J., Radek R., Konig H.** *Spirochaeta coccodes* sp. nov., a Novel Coccoid Spirochete from the Hindgut of the Termite *Neotermes Castaneus* // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2006. - V. 72. - №1. - P. 392-397.
72. **Dwyer D.F., Weeg-Aerssens E., Shelton D.R., Tiedje J.M.** Bioenergetic Conditions of Butyrate Metabolism by a Syntrophic, Anaerobic Bacterium in Coculture with Hydrogen-Oxidizing Methanogenic and Sulfidogenic Bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1988. - V. 54. - №6. - P. 1354-1359.
73. **Eichler B., Schink B.** Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes // *Archives of Microbiology*. - 1985. - V. 143. - №1. - P. 60-66.
74. **Elkins J.G., Podar M., Graham D.E., Makarova K.S., Wolf Y., Randau L., Hedlund B.P., Brochier-Armanet C.I., Kunin V., Anderson I.** A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2008. - V. 105. - №23. - P. 8102-8107.
75. **Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W.** Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics // *Science*. 2015. - V. 350. - №6259. - P. 434-438.
76. **Ferry J. G.** Fermentation of acetate // *Methanogenesis*. – Springer US, 1993. – P. 304-334.
77. **Ferry J.G.** The chemical biology of methanogenesis // *Planetary and Space Science*. - 2010. - V. 58. - №14. - P. 1775-1783.
78. **Fischer E., Martínez G.M., Elliott H.M., Rennó N.O.** Experimental evidence for the formation of liquid saline water on Mars // *Geophys Research Letters*. - 2014. - V. 41. - №13. - P. 4456-4462.

79. **Formisano V.** Detection of Methane in the Atmosphere of Mars // Science. -2004. - V. 306. - №5702. - P. 1758-1761.
80. **Franzmann P.D., Liu Y., Balkwill D.L., Aldrich H.C., Conway De Macario E., Boone D.R.** *Methanogenium frigidum* sp. nov., a Psychrophilic, H₂-Using Methanogen from Ace Lake, Antarctica // Analysis. - 1997. - V. 47. - №4. - P. 1068-1072.
81. **Franzmann P.D., Springer N., Ludwig W., Conway De Macario E., Rohde M.** A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. // Systematic and Applied Microbiology. - 1992. - V. 15. №4. - P. 573-581.
82. **Friedrich M.W.** Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea // Methods in Enzymology. - 2005. - V. 397. - P. 428-442.
83. **Friedmann E. I.** Permafrost as microbial habitat // Viable microorganisms in permafrost. – 1994. – P. 21-26.
84. **Ganzert L., Jurgens G., Münster U., Wagner D.** Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints // FEMS Microbiology and Ecology. - 2007. - V. 59. - №2. - P. 476-488.
85. **Garcia J.-L., Patel B.K.C., Ollivier B.** Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea // Anaerobe. - 2000. - V. 6. - №4. - P. 205-226.
86. **Gilichinsky D., Wagener S., Vishnevetskaya T.** Permafrost microbiology // Permafrost and Periglacial Processes. - 1995. - V. 6. - №4. - P. 281-291.
87. **Gilichinsky D.** Permafrost as microbial habitat: Paleontology of viable organisms // Science et technique du froid. - 1998. - P. 259-260.
88. **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.
89. **Gilichinsky D. Permafrost** // In: Bitton G (ed) Encyclopedia of environmental microbiology. - Wiley, New York, 2002. - P. 2367–2385.

90. **Gilichinsky D., E. Rivkina, V. Shcherbakova, K. Laurinavichuis, and J. Tiedje.** Supercooled water brines within permafrost - an unknown ecological niche for microorganisms: A model for astrobiology // *Astrobiology*. - 2003. - V. 3. - №2. - P. 331-341.
91. **Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C., Shcherbakova V., Petrovskaya L., Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Laurinavichuis K., Pecheritsina S.** Biodiversity of cryopegs in permafrost // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2005. - V. 53. - №1. - P. 117-128.
92. **Gilichinsky D.A., Wilson G.S., Friedmann E.I., McKay C.P., Sletten R.S., Rivkina E.M., Vishnivetskaya T.A., Erokhina L.G., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Shcherbakova V.A., Soina V.S., Spirina E.V., Vorobyova E.A., Fyodorov-Davydov D.G., Hallet B., Ozerskaya S.M., Sorokovikov V.A., Laurinavichyus K.S., Shatilovich A.V., Chanton J.P., Ostroumov V.E., Tiedje J.M.** Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. // *Astrobiology*. - 2007. - V. 7. - P. 275-311.
93. **Gilichinsky, D., Vishnivetskaya, T., Petrova, M. et al.** Bacteria in Permafrost / In: Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C. (Eds.), *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. - 2008. – P. 83.
94. **Gilichinsky D. and E. Rivkina.** Permafrost Microbiology // *Encyclopedia of Geobiology*. - Springer Netherlands, 2011. - P. 726-732.
95. **Gogarten J.P., Kibak H., Dittrich P., Taiz L., Bowman E.J., Bowman B.J., Manolson M.F., Poole R.J., Date T., Oshima T.** Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. -1989. - V. 86. - №17. - P. 6661-6665.
96. **Good I. J.** The population frequencies of species and the estimation of population parameters // *Biometrika*. – 1953. – V. 40. – №3-4. – P. 237-264.
97. **Gounot A. M.** Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 1986. – V. 42. – №11. – P. 1192-1197.

98. **Gupta R.S.** Protein phylogenies and signature sequences: evolutionary relationships within prokaryotes and between prokaryotes and eukaryotes // *Antonie van Leeuwenhoek*. - 1997. - V. 72. - №1. - P. 49-61.
99. **Gupta R.S.** Life's Third Domain (Archaea): An Established Fact or an Endangered Paradigm?: A New Proposal for Classification of Organisms Based on Protein Sequences and Cell Structure // *Theoretical Population Biology*. - 1998. - V. 54. - №2. - P. 91-104.
100. **Guy L., Ettema T.J.** The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes // *Trends in Microbiology*. 2011. - V. 19. - №12. - P. 580-587.
101. **Hales B.A., Edwards C., Ritchie D.A., Hall G., Pickup R.W., Saunders J.R.** Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1996. - V. 62. - №2. - P. 668-675.
102. **Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W.** Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // *Nature*. - 2013. - V. 500. - №7464. - P. 567-570.
103. **He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Fang J., Xie J., Sievert S., Wang F.** Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments // *Nature Microbiology*. - 2016. - V. 1. - P. 16035.
104. **Hecht M.H., Kounaves S.P., Quinn R.C., West S.J., Young S.M.M., Ming D.W., Catling D.C., Clark B.C., Boynton W.V., Hoffman J., Deflores L.P., Gospodinova K., Kapit J., Smith P.H.** Detection of perchlorate and the soluble chemistry of martian soil at the Phoenix lander site // *Science (New York, NY)*. - 2009. - V. 325. - №5936. - P. 64-7.
105. **Hedlund B.P., Murugapiran S.K., Alba T.W., Levy A., Dodsworth J.A., Goertz G.B., Ivanova N., Woyke T.** Uncultivated thermophiles: current status and spotlight on 'Aigarchaeota' // *Current Opinion in Microbiology*. 2015. - V. 25. - P. 136-145.

106. **Hedderich R., Whitman W. B.** Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea // *The Prokaryotes*. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 635-662.
107. **Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.** Real Time Quantitative PCR // *Genome Methods*. - 2012. -V. 6. – №10. - P. 986-994.
108. **Hespell R.B.** *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1981. -V. 41. - №4. - P. 1029-1039.
109. **Hitchcock D.R., Lovelock J.E.** Life detection by atmospheric analysis // *Icarus*. - 1967. -V. 7. - №1-3. - P.149-159.
110. **Hoj, L., Olsen, R.A., Torsvik, V.L.** Archaeal communities in High Arctic wetlands at Spitsbergen, Norway as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2005. – V. 53. – №1. - P. 89-102.
111. **Hoj L., Olsen R.A., Torsvik V.L.** Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high Arctic peat // *International Society for Microbial Ecology*. - 2008. - V. 2. - №1. - P. 37-48.
112. **Hsueh P.-R., Lee T.-F., Du S.-H., Teng S.-H., Liao C.-H., Sheng W.-H., Teng L.-J.** Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species // *Journal of Clinical Microbiology*. - V. 52. - №7. - P. 2371-2379.
113. **Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O.** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // *Nature*. - 2002. - V. 417. - №6884. - P. 63-67.
114. **Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K.-i., Igarashi Y., Haruta S.** *Candidatus Methanogranum caenicola*: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a

- Methanogenic Lineage of the Class *Thermoplasmata* // Microbes and Environments. - 2013. - V. 28. - №2. - P. 244-250.
115. **Iwabe N., Kuma K.-i., Hasegawa M., Osawa S., Miyata T.** Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1989. - V. 86. - №23. - P. 9355-9359.
 116. **James N., Sutherland M. L.** Are there living bacteria in permanently frozen subsoil? // Canadian Journal of Research. – 1942. – V. 20. – №4. – P. 228-235.
 117. **Janssen H., Bock E.** Profiles of ammonium, nitrite and nitrate in the permafrost soils // Viable microorganisms in permafrost. Pushchino Research Centre Russian Academy of Sciences, Pushchino. – 1994. – P. 27-36.
 118. **Jansson J.K., Taş N.** The microbial ecology of permafrost // Nature Reviews Microbiology. - 2014. - V. 12. - №6. - P. 414-425.
 119. **Jeanthon C., Reysenbach A.L., L'Haridon S., Gambacorta A., Pace N.R., Glénat P., Prieur D.** *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir // Archives of Microbiology. - 1995. - V. 164. - №2. - P. 91-97.
 120. **Johnson S.S., Hebsgaard M.B., Christensen T.R., Mastepanov M., Nielsen R., Munch K., Brand T., Gilbert M., Zuber M., Bunce M., Rønn R., Gilichinsky D., Froese D., Willerslev E.** Ancient bacteria show evidence of DNA repair // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – V. 104. – №. 36. – P. 14401-14405.
 121. **Jorgensen S.L., Hannisdal B., Lanzén A., Baumberger T., Flesland K., Fonseca R., Øvreås L., Steen I.H., Thorseth I.H., Pedersen R.B.** Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. - V. 109. - №42. - P. E2846-E2855.
 122. **Hungate R. E.** Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // Methods in Microbiology. – 1969. – V. 3. – P. 117-132.

123. **Kandler O., Konig H.** Cell envelopes of archaea: structure and chemistry // New Comprehensive Biochemistry. - 1993. - V. 26. - P. 223-259.
124. **Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T. A., Brouchkov, A., Fukuda, M., Tomita F., Asano, K.** *Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Microbacteriaceae* isolated from a permafrost ice wedge // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – V. 59. – №3. – P. 482-486.
125. **Kendall M.M., Wardlaw G.D., Tang C.F., Bonin A.S., Liu Y., Valentine D.L.** Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - V.73. - №2. - P. 407-414.
126. **Kendrick M.G., Kral T.A.** Survival of methanogens during desiccation: implications for life on Mars // Astrobiology. - 2006. -V. 6. - №4. - P. 546-551.
127. **Khlebnikova G., Gilichinskii D., Fedorov-Davydov D., Vorob'eva E.** Quantitative evaluation of microorganisms in permafrost deposits and buried soils // Microbiology (New York). - 1990. - V. 59. - №1. - P. 106-112.
128. **Khmelenina V.N., Makutina V.A., Kalyuzhnaya M.G., Rivkina E.M., Gilichinsky D. A., Trotsenko Y. A.** Discovery of viable methanotrophic bacteria in permafrost sediments of northeast Siberia // Doklady Biological Sciences. – MAIK Nauka/Interperiodica. - 2002. – V. 384. – №. 1. – P. 235-237.
129. **Kitamura K., Fujita T., Akada S., Tonouchi A.** *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2011. -V. 61. - P. 1246-1252.
130. **Kobabe S., Wagner D., Pfeiffer E.M.** Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation // FEMS Microbiology and Ecology. - 2004. - V. 50. - P. 13-23.
131. **Koch K., Knoblauch C., Wagner D.** Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea // Environmental Microbiology. – 2009. – V. 11. – №3. – P. 657-668.

132. **Koonin E.V., Mushegian A.R., Galperin M.Y., Walker D.R.** Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea // *Molecular Microbiology*. - 1997. - V. 25. - №4. - P. 619-637.
133. **Kotelnikova S., Macario A.J.L., Pedersen K.** *Methanobacterium subterraneurn* // *International Journal of Systematic Bacteriology*. - 1998. - V. 48. - P. 357-367.
134. **Kotsyurbenko O., Simankova M., Nozhevnikova A., Zhilina T., Bolotina N., Lysenko A., Osipov G.** New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov // *Archives of Microbiology*. - 1995. - V. 163. - №1. - P. 29-34.
135. **Kotsyurbenko O.R., Nozhevnikova A.N., Soloviova T.I., Zavarzin G.A.** Methanogenesis at low temperatures by microflora of tundra wetland soil // *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. - 1996. - V. 69. - P. 75-86.
136. **Kotsyurbenko O.R., Chin K.J., Glagolev M.V., Stubner S., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Conrad R.** Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog // *Environmental Microbiology*. - 2004. - V. 6. - P. 1159-1173.
137. **Kozubal M.A., Macur R.E., Jay Z.J., Beam J.P., Malfatti S.A., Tringe S.G., Kocar B.D., Borch T., Inskeep W.P.** Microbial iron cycling in acidic geothermal springs of Yellowstone National Park: integrating molecular surveys, geochemical processes, and isolation of novel Fe-active microorganisms // *Frontiers in Microbiology*. -2012. -V. 3.
138. **Kozubal M.A., Romine M., deM Jennings R., Jay Z.J., Tringe S.G., Rusch D.B., Beam J.P., McCue L.A., Inskeep W.P.** *Geoarchaeota*: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park // *International Society for Microbial Ecology*. – 2013. - V. 7. - №3. - P. 622.

139. **Krader P., Emerson D.** Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry // *Extremophiles*. - 2004. - V. 8. - №4. - P. 259-268.
140. **Kraev G.N., Schultze E.-D., Rivkina E.M.** Cryogenesis as a factor of methane distribution in layers of permafrost // *Doklady Earth Sciences*. - 2013. -V. 451. - №2. - P. 882-885.
141. **Krasnopol'sky V.A., Maillard J.P., Owen T.C.** Detection of methane in the martian atmosphere: Evidence for life? // *Icarus*. -2004. - V. 172. - №2. - P. 537-547.
142. **Krivushin K., Kondrashov F., Shmakova L., Tutukina M., Petrovskaya L., Rivkina E.** Two Metagenomes from Late Pleistocene Northeast Siberian Permafrost // *Genome Announcements*. - 2015. -V. 3. - №1. - P. 01380-14.
143. **Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M.** *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2010. - V. 60. - №2. - P. 455-459.
144. **Kubo K., Lloyd K.G., Biddle J.F., Amann R., Teske A., Knittel K.** Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments // *International Society for Microbial Ecology*. – 2012. - V. 6. - №10. - P. 1949.
145. **Könneke M., Bernhard A.E., de La Torre J.R., Walker C.B.** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature*. - 2005. - V. 437. - №7058. - P. 543.
146. **Lane D.J.** 16S/23S rRNA sequencing / *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). – New York: John Wiley and Sons, – 1991. – P. 125-175.
147. **Lazar C.S., Baker B.J., Seitz K., Hyde A.S., Dick G.J., Hinrichs K., Teske A.P.** Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of *Bathyarchaeota* in estuarine sediments // *Environmental Microbiology*. – 2016. - V.18. - №4. - P. 1200-1211.

148. **Leadbetter J.R., Breznak J.A.** Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – №10. – P. 3620-3631.
149. **Leahy S.C., Kelly W.J., Ronimus R.S., Wedlock N., Altermann E., Attwood G.T.** Genome sequencing of rumen bacteria and archaea and its application to methane mitigation strategies // *Animal*. - 2013. - V. 7. - Nos2. - P. 235-243.
150. **Leaver M., Domínguez-Cuevas P., Coxhead J.M., Daniel R.A., Errington J.** Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis* // *Nature*. - 2009. - V. 460. - №7231. - P. 538-538.
151. **Li W., Godzik A.** Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences // *Bioinformatics*. – 2006. – V. 22. – №13. – P. 1658-1659.
152. **Liebensteiner M.G., Pinkse M.W.H., Schaap P.J., Stams A.J.M., Lomans B.P.** Archaeal (Per)Chlorate Reduction at High Temperature: An Interplay of Biotic and Abiotic Reactions // *Science*. - 2013. - V. 340. - №6128. - P. 85-87.
153. **Liebner S., Wagner D.** Abundance, distribution and potential activity of methane oxidizing bacteria in permafrost soils from the Lena Delta, Siberia // *Environmental Microbiology*. - 2007. - V. 9. - №1. - P. 107-117.
154. **Lin X., Handley K.M., Gilbert J.A., Kostka J.E.** Metabolic potential of fatty acid oxidation and anaerobic respiration by abundant members of Thaumarchaeota and Thermoplasmata in deep anoxic peat // *International Society for Microbial Ecology*. – 2015. - V. 9. - №12. - P. 2740-2744.
155. **Lloyd K., Schreiber L., Petersen D., Kjeldsen K., Lever M. a, Steen AD, Stepanauskas R, Richter M, Kleindienst S, Lenk S, Schramm A, Jorgensen BB.** 2013. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // *Nature*. – 2013. - V. 496. - №7444. - P. 215-218.
156. **Lomans B.P., Maas R., Luderer R., M. H.J., Den Camp O., Pol A., van der Drift C., Vogels G.D.** Isolation and Characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., Isolated from Freshwater Sediment, a Methylotrophic

- Methanogen Able To Grow on Dimethyl Sulfide and Methanethiol // Applied and Environmental Microbiology. - 1999. - V. 65. - №8. - P. 3641-3650.
157. **Luton P.E., Wayne J.M., Sharp R.J., Riley P.W.** The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill // Microbiology. - 2002. - V. 148. - №11. - P. 3521-3530.
 158. **Mah R.A., Kuhn D.A.** Rejection of the Type Species *Methanosarcina methanica* (Approved Lists 1980), Conservation of the Genus *Methanosarcina* with *Methanosarcina barkeri* (Approved Lists 1980) as the Type Species , and Emendation of the Genus *Methanosarcina* // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1984. - V. 34. – №2. - P. 266-267.
 159. **Margulis L., Margulis L.** Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archean and Proterozoic eons.: 2nd ed. // New York : Freeman . – 1993. – P. 452.
 160. **Marmur J.** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // Journal of molecular biology. – 1961. – V. 3. – №2. – P. 208IN1-218.
 161. **Martínez-Espinosa R.M., Richardson D.J., Bonete M.J.** Characterisation of chlorate reduction in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei* // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. - 2015. - V. 1850. - №4. - P. 587-594.
 162. **McElvania TeKippe E.M., Burnham C.-A.** Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 2014. - V. 33. - №12. - P. 2163-2171.
 163. **McInerney M.J., Bryant M.P., Pfennig N.** Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens // Archives of Microbiology. - 1979. - V. 122. - №2. - P. 129-135.
 164. **Meng J., Xu J., Qin D., He Y., Xiao X., Wang F.** Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses // International Society for Microbial Ecology. - 2014. -V. 8. - №3. - P. 650-659.

165. **Mesbah N. M., Whitman W. B., Mesbah M.** Determination of the G+C Content of Prokaryotes // *Methods in Microbiology*. – 2011. – V. 38. – P. 299-324.
166. **Minnikin D.E., Collins M.D., Goodfellow M.** Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa // *Journal of Applied Microbiology*. – 1979. – V. 47. – №1. – P. 87-95.
167. **Miteva, V. I., Sheridan, P. P., Brenchley, J. E.** Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – V. 70. – №1. – P. 202-213.
168. **Miyazaki M., Sakai S., Ritalahti K.M., Saito Y., Yamanaka Y., Saito Y., Tame A., Uematsu K., Löffler F.E., Takai K., Imachi H.** *Sphaerochaeta multiformis* sp. nov., an anaerobic, psychrophilic bacterium isolated from subseafloor sediment, and emended description of the genus *Sphaerochaeta* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2014. - V. 64. - №12. - P. 4147-4154.
169. **Morita R. Y., Morita R. Y.** Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle. New York : Chapman & Hall. - 1997. – P. 1.
170. **Mumma M.J., Villanueva G.L., Novak R.E., Hewagama T., Bonev B.P., DiSanti M.A., Mandell A.M., Smith M.D.** Strong Release of Methane on Mars in Northern Summer 2003 // *Science*. - 2009. - V. 323. - №5917 - P. 1041-1045.
171. **Murakami S., Fujishima, K., Tomita M., Kanai A.** Metatranscriptomic analysis of microbes in an Oceanfront deep-subsurface hot spring reveals novel small RNAs and type-specific tRNA degradation // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – V. 78. – №4. – P. 1015-1022.
172. **Murray R.** Microbial structure as an aid to microbial classification and taxonomy // *Spisy Prirodoved Fak Univ JE Purkyne Brne*. - 1968. -V. 43. - P. 249-252.
173. **Murray R., Doetsch R., Robinow C.** Methods for General and Molecular Bacteriology. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Kreig N.R. (eds). – Washington DC: American Society for Microbiology, 1994. – P. 791.

174. **Musfeldt M., Schönheit P.** Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii* // Journal of Bacteriology. - 2002. -V. 184. - №3. - P. 636-644.
175. **Narihiro T., Sekiguchi Y.** Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea // Microbial Biotechnology. - 2011. - V. 4. - №5. - P. 585-602.
176. **Neufeld J.D., Mohn W.W.** Unexpectedly High Bacterial Diversity in Arctic Tundra Relative to Boreal Forest Soils , Revealed by Serial Analysis of Ribosomal Sequence Tags // Applied and Environmental Microbiology. - 2005. -V. 71. - №10. - P. 5710-5718.
177. **Nozhevnikova A.N., Zepp K., Vazquez F., Zehnder A.J.B., Holliger C.** Evidence for the existence of psychrophilic methanogenic communities in anoxic sediments of deep lakes // Applied and Environmental Microbiology. - 2003. -V. 69. - №3. - P. 1832-1835.
178. **Nunoura T., Hirayama H., Takami H., Oida H., Nishi S., Shimamura S., Suzuki Y., Inagaki F., Takai K., Nealson K.H.** Genetic and functional properties of uncultivated thermophilic crenarchaeotes from a subsurface gold mine as revealed by analysis of genome fragments // Environmental Microbiology. - 2005. - V. 7. - №12. - P. 1967-1984.
179. **Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.-J., Hattori M., Kanai A., Atomi H.** Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group // Nucleic Acids Research. - 2010 - V. 39. - №8. - P. 3204-3223.
180. **Nunoura T., Oida H., Miyazaki J., Miyashita A., Imachi H., Takai K.** Quantification of mcrA by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities // FEMS Microbiology and Ecology. - 2008. -V. 64. - №2. - P. 240-247.

181. **Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C.** Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR // *Environmental Microbiology*. -2003. -V. 5. - №9. - P. 787-797.
182. **Offre P., Spang A., Schleper C.** Archaea in biogeochemical cycles // *Annual Review of Microbiology*. – 2007. - V.67.
183. **Omel'Chenko M., Vasil'Eva L., Zavarzin G., Savel'Eva N., Lysenko A., Mityushina L., Khmelenina V., Trotsenko Y.A.** A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter* // *Microbiology*. - 1996. - V. 65. - №3. - P. 339-343.
184. **Oren A., Elevi Bardavid R., Mana L.** Perchlorate and halophilic prokaryotes: Implications for possible halophilic life on Mars // *Extremophiles*. - 2014. - V. 18. - №1. - P. 75-80.
185. **Ostroumov V.** Physico-chemical processes in cryogenic soils / *Cryosols*. Springer Berlin Heidelberg. - 2004. - P. 347-364.
186. **Owen R. J., Pitcher D.** Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization // *Society for Applied Bacteriology. Technical Series*. – 1985. – №20. – P. 67-93.
187. **Pavlovic M., Mewes A., Maggipinto M., Schmidt W., Messelhäuser U., Balsliemke J., Hörmansdorfer S., Busch U., Huber I.** MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates // *Journal of Microbiological Methods*. – 2014. -V. 106. - P. 123-128.
188. **Paul K., Nonoh J.O., Mikulski L., Brune A.** "Methanoplasmatales," thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2012. - V. 78. - №23. - P. 8245-8253.
189. **Panikov, N.S., Flanagan, P.W., Oechel, W.C. et al.** Microbial activity in soils frozen to below -39°C // *Soil Biology and Biochemistry*. - 2006. - V. 38. – №4. - P. 785-794.

190. **Panikov, N.S., Sizova, M.V.** Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -5 °C // FEMS Microbiology and Ecology. - 2007. - V. 59. – №2. - P. 500-512.
191. **Parshina S.N., Ermakova A.V., Bomberg M., Detkova E.N.** *Methanospirillum stamsii* sp. nov., a psychrotolerant, hydrogenotrophic, methanogenic archaeon isolated from an anaerobic expanded granular sludge bed bioreactor operated at low temperature // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. – V. 64. – №1. – P. 180-186.
192. **Pecheritsyna, S.A., Rivkina, E.M., Akimov, V.N., & Shcherbakova, V.A.** *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012. – V. 62. – №1. – P. 33-37.
193. **Pester M., Schleper C., Wagner M.** The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // Current Opinion in Microbiology. - V. 14. - №3. - P. 300-306.
194. **Ponder, M.A., Gilmour, S.J., Bergholz, P.W. et al.** Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria // FEMS Microbiology and Ecology. - 2005. - V. 53. – №1. - P. 103-115.
195. **Pühler G., Leffers H., Gropp F., Palm P., Klenk H.-P., Lottspeich F., Garrett R.A., Zillig W.** Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1989. - V. 86. - №12. - P. 4569-4573.
196. **Ran, Y., Li, X., Cheng, G., Zhang, T., Wu, Q., Jin, H., Jin, R.** Distribution of permafrost in China: an overview of existing permafrost maps // Permafrost and Periglacial Processes. – 2012. – V. 23. – №4. – P. 322-333.
197. **Raymann K., Brochier-Armanet C.I., Gribaldo S.** The two-domain tree of life is linked to a new root for the Archaea // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. - V.112. - №21. - P. 6670-6675.
198. **Reid I.N., Sparks W.B., Lubow S., McGrath M., Livio M., Valenti J., Sowers K.R., Shukla H.D., MacAuley S., Miller T., Suvanasuthi R., Belas R., Colman**

- A., Robb F.T., DasSarma P., Müller J.A., Coker J.A., Cavicchioli R., Chen F., DasSarma S.** Terrestrial models for extraterrestrial life: methanogens and halophiles at Martian temperatures // International Journal of Astrobiology. -2006. - V. 5. - №2. - P. 89.
199. **Reynolds E.S.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // The Journal of cell biology. – 1963. – V. 17. – №1. – P. 208.
200. **Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J., Cheng J.-F., Darling A., Malfatti S.A., Swan B.K., Gies E.A.** Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. – 2013.
201. **Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D., Cusick K.D., Ramos-Hernandez N., Rubin M., Dornbush J., Löffler F.E.** *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2011. - V. 62. - №1. - P. 210-216.
202. **Rivkina Y. M., Samarkin V. A., Gilinskiy D. A.** Methane and permafrost soil of the Kolyma-Indigir lowland // Eurasian Soil Science. – 1992. – V. 25. – №1. – P. 50-53.
203. **Rivkina E., Gilichinsky D., Wagener S., Tiedje J., McGrath J.** Biogeochemical activity of anaerobic microorganisms from buried permafrost sediments // Geomicrobiology Journal. - 1998. - V. 15. - №3. - P. 187-193.
204. **Rivkina, E. M., Friedmann, E. I., McKay, C. P., & Gilichinsky, D. A.** Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – V. 66. – №8. – P. 3230-3233.
205. **Rivkina, E., Gilichinsky, D., McKay, C., Dallimore, S.** Permafrost Response on Economic Development // Environmental security and Natural Potential. – 2001. – P. 487-496.
206. **Rivkina, E. M., Laurinavichus, K. S., Gilichinsky, D. A., & Shcherbakova, V. A.** Methane generation in permafrost sediments // Doklady Biological Sciences. – Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2002. – V. 383. – №1-6. – P. 179-181.

207. **Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J., Tiedje J., Shcherbakova V., Gilichinsky D.** Microbial life in permafrost // *Advances in Space Research*. -2004. - V. 33. - №8. - P. 1215-1221.
208. **Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichius K., Petrovskaya L., Krivushin K., Kraev G., Pecheritsina S., Gilichinsky D.** Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost // *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2007. - V. 61. - №1. - P. 1-15.
209. **Rivkina E., Kraev G.** Permafrost degradation and influx of biogeogases into the atmosphere // *Ninth International Conference on Permafrost*, Fairbanks, USA, University of Alaska Fairbanks. – 2008. – V. 29. – P. 1499-1504.
210. **Rivkina E., Petrovskaya L., Vishnivetskaya T., Krivushin K., Shmakova L., Tutukina M., Meyers A., Kondrashov F.** Metagenomic analyses of the late Pleistocene permafrost - Additional tools for reconstruction of environmental conditions // *Biogeosciences*. - 2016. - V. 13. - №7. - P. 2207-2219.
211. **Rodrigues, D.F., Jesus, E.d.C., Ayala-del-Rio, H.L., Pellizari V.H., Gilichinsky D., Sepulveda-Torres L., Tiedje, J.M.** Biogeography of two cold adapted genera *Psychrobacter* and *Exiguobacterium* // *International Society for Microbial Ecology*. - 2009. – V. 3. – №6. - P. 658-665.
212. **Rossello-Mora R., Urdiaín M., Lopez-Lopez A.** DNA-DNA Hybridization / *Methods in Microbiology*. In: Rainey F., Oren A. (eds). V.38. – 2011. – P. 325-347.
213. **Rummel J.D., Beaty D.W., Jones M.A., Bakermans C., Barlow N.G., Boston P.J., Chevrier V.F., Clark B.C., de Vera J.-P.P., Gough R.V., Hallsworth J.E., Head J.W., Hipkin V.J., Kieft T.L., McEwen A.S., Mellon M.T., Mikucki J.A., Nicholson W.L., Omelon C.R., Peterson R., Roden E.E., Sherwood Lollar B., Tanaka K.L., Viola D., Wray J.J.** A New Analysis of Mars “Special Regions”: Findings of the Second MEPAG Special Regions Science Analysis Group (SR-SAG2) // *Astrobiology*. - 2014. -V. 14. - P. 887-968.
214. **Saitou N., Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – V. 4. – №4. – P. 406-425.

215. **Sakai S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y.** *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2008. - V. 58. - №4. - P. 929-936.
216. **Sasser M.** Identification of bacteria through fatty acid analysis // Methods in phytobacteriology. – 1990. – P. 199-204.
217. **Savant D.V., Shouche Y.S., Prakash S., Ranade D.R.** *Methanobrevibacter acididurans* sp. nov., a novel methanogen from a sour anaerobic digester // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2002. - V. 52. - №4. - P. 1081-1087.
218. **Schirrmeister L., Kunitsky V., Grosse G., Wetterich S., Meyer H., Schwamborn G., Babiy O., Derevyagin A., Siegert C.** Sedimentary characteristics and origin of the Late Pleistocene Ice Complex on north-east Siberian Arctic coastal lowlands and islands—A review // Quaternary international. – 2011. - V. 241. - №1. - P. 3-25.
219. **Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Bottger E.C., Hombach M.** Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory// Journal of Clinical Microbiology. – 2014. - P. 1089-1097.
220. **Schuur E.A.G., Bockheim J., Canadell J.G., Euskirchen E., Field C.B., Goryachkin S.V., Hagemann S., Kuhry P., Lafleur P.M., Lee H., Mazhitova G., Nelson F.E., Rinke A., Romanovsky V.E., Shiklomanov N., Tarnocai C., Venevsky S., Vogel J.G., Zimov S.A.** Vulnerability of permafrost carbon to climate change: Implications for the global carbon cycle // BioScience. - 2008. - V. 58. - №8. - P. 701-714.
221. **Schuur E. A. G., McGuire A. D., Schädel C., Grosse G., Harden J. W., Hayes D. J., Hugelius G., Koven C. D., Kuhry P., Lawrence D. M., Natali S. M., Olefeldt D., Romanovsky V. E., Schaefer K., Turetsky M. R., Treat C. C., Vonk J. E.** Climate

- change and the permafrost carbon feedback // *Nature*. – 2015. – V. 520. – №7546. – P. 171-179.
222. **Seitz K.W., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P., Baker B.J.** Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction // *International Society for Microbial Ecology*. – 2016. - V. 10. - №7. - P. 1696.
223. **Shcherbakova V., Rivkina E., Laurinavichuis K., Pecheritsina S., Gilichinsky D.** Physiological characteristics of bacteria isolated from water brines within permafrost // *International Journal of Astrobiology*. - 2004. -V. 3. - №1. - P. 37-43.
224. **Shcherbakova, V. A., Chuvilskaya, N. A., Rivkina, E. M., Pecheritsyna, S. A., Laurinavichius, K. S., Suzina, N. E., Osipov G. A., Lysenko A. M., Gilichinsky D. A., Akimenko V. K.** Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algorithilum* sp. nov // *Extremophiles*. – 2005. – V. 9. – №3. – P. 239-246.
225. **Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D.** *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2011. -V. 61. - №1. - P. 144-147.
226. **Shcherbakova, V., Chuvilskaya, N., Rivkina, E., Demidov, N., Uchaeva, V., Suetin, Suzina N., Gilichinsky, D.** *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63. – №12. – P. 4421-4427.
227. **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.
228. **Shcherbakova, V., Yoshimura, Y., Ryzhmanova, Y., Taguchi, Y., Segawa, T., Oshurkova, V., Rivkina, E.** Archaeal communities of Arctic methane-containing

- permafrost //FEMS Microbiology and Ecology. – 2016. – V. 92. – №. 10. – P. fiw135.
229. **Shi T., Reeves R.H., Gilichinsky D.A., Friedmann E.I.** Characterization of viable bacteria from siberian permafrost by 16S rDNA sequencing // Microbial Ecology. - 1997. - V. 33. - №3. - P. 169-179.
 230. **Shih C.-J., Chen S.-C., Weng C.-Y., Lai M.-C., Yang Y.-L.** Rapid identification of haloarchaea and methanoarchaea using the matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Scientific Reports. – 2015 - V. 5.
 231. **Shimizu S., Ueno A., Naganuma T., Kaneko K.** *Methanosarcina subterranea* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface diatomaceous shale formation // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2015. - V. 65. - №4. - P. 1167-1171.
 232. **Shlimon A.G., Friedrich M.W., Niemann H., Ramsing N.B., Finster K.** *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2004. - V. 54. - №3. - P. 759-763.
 233. **Shmelev D., Kraev G., Veremeeva A., Rivkina E.M.** Carbon storage, Kolyma-Indigirka lowland, permafrost, yedoma subhorizon // Earth. – 2013. – V. 17. – P. 50-9.
 234. **Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., Osipov G.A., Nozhevnikova A.N.** *Acetobacterium tundrae* sp. nov., a new psychrophilic acetogenic bacterium from tundra soil // Archives of Microbiology. - 2000. - V. 174. - №6. - P. 440-447.
 235. **Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V.Z., Alexander J.B., Nozhevnikova A.N.** *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a New Psychrotolerant Methanogenic Archaeon from Anoxic Lake Sediments // Systematic and Applied Microbiology. - 2001. - V. 24. - №3. - P. 362-367.
 236. **Sorokin D.Y., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Tourova T.P., Abbas B., Muyzer G.** Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda

- Steppe (Altai, Russia) // FEMS Microbiology and Ecology. - 2010. - V. 73. - №2. - P. 278-290.
237. **Spang A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M., Schleper C.** Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota* // Trends in Microbiology. - 2010. - V. 18. - №8. - P. 331-340.
238. **Spang A., Martijn J., Saw J.H., Lind A.E., Guy L., Ettema T.J.** Close encounters of the third domain: the emerging genomic view of archaeal diversity and evolution // Archaea. – 2013. - V.2013.
239. **Springer E., Sachs M.S., Woese C.R., Boone D.R.** Partial Gene Sequences for the A Subunit of Methyl-Coenzyme M Reductase (mcrI) as a Phylogenetic Tool for the Family *Methanosarcinaceae* // International Journal of Systematic Bacteriology. - 1995. - V. 45. - №3. - P. 554-559.
240. **Stanier R., Adelberg E., Ingraham J.** The Microbial World. Prentice Hall // Inc New Jersey. – 1976. - P. 276. -1976.
241. **Stetter K.O.** Hyperthermophiles in the history of life // Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences. - 2006. - V. 361. - №1474. - P. 1837-1843.
242. **Steven B., Briggs G., McKay C.P., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G.** Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. // FEMS Microbiology and Ecology. - 2007. - V. 59. - №2. - P. 513-23.
243. **Steven B., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G.** Microbial diversity and activity through a permafrost/ground ice core profile from the Canadian high Arctic // Environmental Microbiology. - 2008. - V. 10. - №12. - P. 3388-3403.
244. **Steven, B., Leveille, R., Pollard, W.H., Whyte, L.G.** Microbial ecology and biodiversity in permafrost // Extremophiles. - 2006. - V. 10. – №4. - P. 259-267.
245. **Steven, B., Briggs, G., McKay, C. P., Pollard, W. H., Greer, C. W., & Whyte, L. G.** Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the

- Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods // FEMS Microbiology and Ecology. – 2007. – V. 59. – №2. – P. 513-523.
246. **Steven, B., Niederberger, T.D., Whyte, L.G.** Bacterial and Archaeal Diversity in Permafrost /In: Margesin, R. (Ed.)/ Permafrost Soils, Soil Biology, Springer Verlag, Berlin Heidelberg. - 2009. – P. 59-72.
247. **Stevenson A., Cray J.A., Williams J.P., Santos R., Sahay R., Neuenkirchen N., McClure C.D., Grant I.R., Houghton J.D., Quinn J.P., Timson D.J., Patil S.V., Singhal R.S., Antón J., Dijksterhuis J., Hocking A.D., Lievens B., Rangel D.E.N., Voytek M.A., Gunde-Cimerman N., Oren A., Timmis K.N., McGenity T.J., Hallsworth J.E.** Is there a common water-activity limit for the three domains of life? // International Society for Microbial Ecology. - 2015. - V. 9. - №6. - P. 1333-1351.
248. **Stewart L.C., Jung J.H., Kim Y.T., Kwon S.W., Park C.S., Holden J.F.** *Methanocaldococcus bathoardescens* sp. Nov., a hyperthermophilic methanogen isolated from a volcanically active deep-sea hydrothermal vent // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2015. - V. 65. - №4. - P. 1280-1283.
249. **Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J.E., Rittmann S.K.M.R., Melcher M., Leisch N., Schleper C.** *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2014. - V. 64. - №8. - P. 2738-2752.
250. **Suetin, S. V., Shcherbakova, V. A., Chuvilskaya, N. A., Rivkina, E. M., Suzina, N. E., Lysenko, A. M., & Gilichinsky, D. A.** *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – V. 59. – №6. – P. 1421-1426.
251. **Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N.** Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6 // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2001. - V. 92. - №2. - P. 144-148.

252. **Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Benno Y.** Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. -2001. - V. 67. - №6. - P. 2766-2774.
253. **Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – V. 30. – №12. – P. 2725-2729.
254. **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic acids research*. – 1994. – V. 22. – №22. – P. 4673-4680.
255. **Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H., Schleper C.** Novel genes for nitrite reductase and AmoB-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling // *Environmental Microbiology*. - 2005. -V. 7. - №12. - P. 1985-1995.
256. **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 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – V. 65. – №. 12. – P. 4315-4322.
257. **Trotsenko, Y.A., Khmelenina, V.N.** Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems// *FEMS Microbiology and Ecology*. - 2005. - V. 53. – №1. - P. 15-26.
258. **Van Everdingen R. O.** (ed.). Multi-language glossary of permafrost and related ground-ice terms in Chinese, English, French, German, Icelandic, Italian, Norwegian, polish, Romanian, Russian, Spanish, and Swedish. – International Permafrost Association, Terminology Working Group, 1998.
259. **Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H., Jensen P.D., Woodcroft B.J., Hugenholtz P., Tyson G.W.** Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota // *Nature Microbiology*. - 2016 - V.1. - P. 16170.

260. **Vianna M.E., Holtgraewe S., Seyfarth I., Conrads G., Horz H.P.** Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease // *Journal of Bacteriology*. -2008. - V. 190. - №10. - P. 3779-3785.
261. **Vishnivetskaya, T.A., Petrova, M.A., Urbance, J. et al.** Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods // *Astrobiology*. - 2006. – V. 6. – №3. - P. 400-414.
262. **Vlek A., Kolečka A., Khayhan K., Theelen B., Groenewald M., Boel E., Boekhout T., Group M.S.** Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2014 -V. 52. - №8. - P. 3023-3029.
263. **Von Klein D., Arab H., Völker H., Thomm M.** *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea // *Extremophiles*. - 2002. - V. 6. - №2. - P. 103-110.
264. **Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M., Minkovskaya N., Zalinova N., Mamukelashvili A., Gilichinsky D., Rivkina E., Vishnivetskaya T.** The deep cold biosphere: facts and hypothesis // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1997. – V. 20. – №3-4. – P. 277-290.
265. **Wagner D., Lipski A., Embacher A., Gatteringer A.** Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: Effects of microbial community structure and organic matter quality // *Environmental Microbiology*. - 2005. - V. 7. - №10. - P. 1582-1592.
266. **Wagner D.** Microbial communities and processes in Arctic permafrost environments // *Microbiology of Extreme Soils*. – 2008. – P. 133-154.
267. **Wagner D., Schirmack J., Ganzert L., Morozova D., Mangelsdorf K.** *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil // *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2013. - V. 63. - №8. - P. 2986-2991.
268. **Walter, K. M., Zimov, S. A., Chanton, J. P., Verbyla, D., & Chapin, F. S.** Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming // *Nature*. – 2006. – V. 443. – №7107. – P. 71-75.
 269. **Wang Q, Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R.** Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73. – №16. – P. 5261-5267.
 270. **Wartiainen I., Hestnes A.G., McDonald I.R., Svenning M.M.** *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78 N) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2006. -V. 56. - №3. - P. 541-547.
 271. **Waters E., Hohn M.J., Ahel I., Graham D.E., Adams M.D., Barnstead M., Beeson K.Y., Bibbs L., Bolanos R., Keller M.** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2003. -V. 100. -№22. - P. 12984-12988.
 272. **Welander P. V., Metcalf W. W.** Loss of the *mtr* operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – V. 102. – №30. – P. 10664-10669.
 273. **Whalen S. C., Reeburgh W. S., Sandbeck K. A.** Rapid methane oxidation in a landfill cover soil // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – V. 56. – №11. – P. 3405-3411.
 274. **Wei S., Cui H., He H., Hu F., Su X., Zhu Y.** Diversity and distribution of archaea community along a stratigraphic permafrost profile from qinghai-tibetan plateau, China // *Archaea*. - 2014. - V. 2014. - P. 1-11.
 275. **Weiss B.P., Yung Y.L., Nealson K.H.** Atmospheric energy for subsurface life on Mars? // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2000. - V. 97. - №4. - P. 1395-1399.

276. **Widdel F., Pfennig N.** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids // Archives of microbiology. – 1981. – V. 129. – №5. – P. 395-400.
277. **Willerslev, E., Hansen, A.J., Ronn, R. et al.** Long-term persistence of bacterial DNA // Current Biology. - 2004. - №1. – P. R9-R10.
278. **Willerslev E., Hansen A. J., Poinar H. N.** Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost //Trends in Ecology and Evolution. – 2004. – V. 19. – №. 3. – P. 141-147.
279. **Wilhartitz I., Mach R.L., Teira E., Reinthaler T., Herndl G.J., Farnleitner A.H.** Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water // Journal of Applied Microbiology. - 2007. - V. 103. - №4. - P. 871-881.
280. **Williams T.A., Szöllösi G.J., Spang A., Foster P.G., Heaps S.E., Boussau B., Ettema T., Embley T.M.** Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – P. 201618463.
281. **Woese C.R., Fox G.E.** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1977. - V. 74. - №11. - P. 5088-5090.
282. **Woese C.R.** Bacterial evolution // Microbiological Reviews. - 1987. - V. 51. - №2. - P. 221.
283. **Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 1990. -V. 87. - №12. -P. 4576-4579.
284. **Woese C.R.** Prokaryote systematics: the evolution of a science // The Prokaryotes. - 1992. -V. 1. - №1. - P. 3-18.
285. **Worakit S., Boone D.R., Mah R.A., Abdel-Samie M.-E., El-Halwagi M.M.** Methanobacterium alcaliphilum // International Journal of Systematic Bacteriology. - 1986. - V. 36. - №3. - P. 380-382.

286. **Yang, D.Q., Wang, J.H., Bai, Y. et al.** Diversity and distribution of the prokaryotic community in near-surface permafrost sediments in the Tianshan Mountains, China// *Canadian Journal of Microbiology*. - 2008. – V.54. – №4. - P. 270-280.
287. **Yang Y.-L., Ladapo J., Whitman W.B.** Pyruvate oxidation by *Methanococcus* spp. // *Archives of Microbiology*. - 1992. -V. 158. - №4. - P. 271-275.
288. **Yashiro Y., Sakai S., Ehara M., Miyazaki M., Yamaguchi T., Imachi H.** *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2011. - V. 61. - №1. - P. 53-59.
289. **Yergeau E., Hogues H., Whyte L.G., Greer C.W.** The functional potential of high Arctic permafrost revealed by metagenomic sequencing, qPCR and microarray analyses // *International Society for Microbial Ecology*. - 2010. - V. 4. - №9. - P. 1206-1214.
290. **Yu Y., Kim J., Hwang S.** Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2006. - V. 93. - №3. - P. 424-433.
291. **Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S.** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2005. - V. 89. - №6. - P. 670-679.
292. **Yutin N., Makarova K.S., Mekhedov S.L., Wolf Y.I., Koonin E.V.** The deep archaeal roots of eukaryotes // *Molecular Biology and Evolution*. - 2008. -V. 25. - №8. - P. 1619-1630.
293. **Yutin N., Puigbò P., Koonin E.V., Wolf Y.I.** Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins // *PloS One*. – 2012. - V. 7. - №5. - P. e36972.
294. **Xiao D., Ye C., Zhang H., Kan B., Lu J., Xu J., Jiang X., Zhao F., You Y., Yan X.** The construction and evaluation of reference spectra for the identification of human pathogenic microorganisms by MALDI-TOF MS // *PloS One*. – 2014 - V. 9. - №9. - P. e106312.

295. **Zak D.R., Kling G.W.** Microbial community composition and function across an arctic tundra landscape // *Ecology*. - 2006. - V. 87. - №7. - P. 1659-1670.
296. **Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Bäckström D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U.** Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*. - V. 541. - №7637. - P. 353-358.
297. **Zehnder A.J.B., Schnellen P.** Methane Formation and Methane Oxidation by Methanogenic Bacteria // *Journal of Bacteriology*. - 1979. - V. 137. - №1. - P. 420-432.
298. **Zhang, G.S., Ma, X.J., Niu, F.J. et al.** Diversity and distribution of alkaliphilic psychrotolerant bacteria in the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region // *Extremophiles*. - 2007. – V. 11. - №3. - P. 415-424.
299. **Zhang G., Jiang N., Liu X., Dong X.** Methanogenesis from methanol at low temperatures by a novel psychrophilic methanogen, "Methanolobus psychrophilus" sp. nov., prevalent in Zoige wetland of the Tibetan plateau // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2008. - V. 74. - №19. - P. 6114-6120.
300. **Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kevbrin V.V., Kolganova T.V.** *Methanocalculus natronophilus* sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family Methanocalculaceae // *Microbiology*. - 2013. - V. 82. - №6. - P. 698-706.
301. **Zimov S.A.** North Siberian Lakes: A Methane Source Fueled by Pleistocene Carbon // *Science*. - 1997. - V. 277. - №5237. - P. 800-802.
302. **Zinder S. H.** Physiological ecology of methanogens // *Methanogenesis*. – Springer US. - 1993. –128-206 p.
303. **Zhou J., Davey M.E., Figueras J.B., Rivkina E., Gilichinsky D., Tiedje J.M.** Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra // *Microbiology*. - 1997. - V. 143. - №12. - P. 3912-3919.
304. **Zhou L., Liu X., Dong X.** *Methanospirillum psychrodurum* sp. nov., isolated from wetland soil // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. - 2014. - V. 64. - №2. - P. 638-641.

305. **Zhu J., Liu X., Dong X.** *Methanobacterium movens* sp. nov. and *methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2011. -V. 61. - №12. - P. 2974-2978.

Приложение 1 . Результаты BLAST для последовательностей 16S рPHK

OTE	Номер GenBank	Общее число клоно в %	Номер GenBank, ближайшего родственника	Сходство, %	Место выделения	Таксономическая принадлежность
KL-16S- OTU0	KF049010	22,1	JQ866672	100	Жемчужная река, Китай	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S- OTU1	KF049011	0,2	HQ407458	95	Цинхай- Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S- OTU2	KF049012	20	LN896493	99	озеро Поян, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S- OTU3	KF049013	0,2	KJ885382	100	рисовые поля, Саньцзянская низменность, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26
KL-16S- OTU4	KF049014	8,8	KU297847	100	Цинхай- Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II
KL-16S- OTU5	KF049015	0,2	KT964758	98	Цинхай- Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S- OTU6	KF049016	5,5	KX463148	100	арктическая мерзлота, Колымская низменность	<i>Ca.</i> ' <i>Methanoperedens</i> '
KL-16S- OTU7	KF049017	3,1	LN796412	100	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanosaeta</i> sp.
KL-16S- OTU8	KF049018	2,4	KR066490	100	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Bathyarchaeota</i> (Miscellaneous Crenarchaeotic Group)
KL-16S- OTU9	KF049019	0,2	JQ792862	99	болотные арктические почвы, Канада	<i>Altiaarchaeum</i> sp.
KL-16S- OTU10	KF049020	4.0	KT323106	99	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Bathyarchaeota</i> (Miscellaneous Crenarchaeotic Group)
KL-16S- OTU11	KF049021	0,2	JQ697132	97	сфагновые торфяные болота Верховье Волги, Россия	<i>Methanosarcina</i> sp.

KL-16S-OTU12	KF049022	0,5	KU297847	94	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II
KL-16S-OTU13	KF049023	0,5	KU297847	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , Rice cluster II
KL-16S-OTU14	KF049024	0,5	JQ079939	97	вулканическое озеро Моноун, Камерун	<i>Ca.</i> 'Methanoperedens', GOM Arc I
KL-16S-OTU15	KF049025	0,2	KC604439	97	водохранилище Махомет, Иллинойс	<i>Ca.</i> 'Methanoperedens', GOM Arc I
KL-16S-OTU16	KF049026	0,5	JF789791	99	пресноводно-болотные почвы, США	<i>Bathyarchaeota</i> (Miscellaneous Crenarchaeotic Group)
KL-16S-OTU17	KF049027	0,2	AF225642	95	рисовники Верчелли, Италия	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26
KL-16S-OTU18	KF049028	0,2	KT964767	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-16S-OTU19	KF049029	0,2	LN795917	98	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU20	KF049030	0,2	KC604439	95	водохранилище Махомет, Иллинойс	<i>Ca.</i> 'Methanoperedens', GOM Arc I
KL-16S-OTU21	KF049031	0,2	EF632729	99	пресноводные отложения, Плато Альтиплано, Чили	<i>Methanosaeta</i> sp.
KL-16S-OTU22	KF049032	0,2	AF056362	99	озеро Сояннг, Корея	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU23	KF049033	4,8	LN796153	99	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Ca.</i> 'Methanoperedens sp.'
KL-16S-OTU24	KF049034	0,2	KJ834210	95	вечная мерзлота, гора Килиан, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU25	KF049035	0,5	LN796180	99	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanoregula</i> sp.

KL-16S-OTU26	KF049036	0,2	KP203220	99	рисовники, Тайбей, Китай	Marine Benthic group D and DHVEG-1
KL-16S-OTU27	KF049037	0,2	KJ644923	99	болотные почвы, Сычуань, Китай	<i>Methanomicrobiales</i> , ARC26
KL-16S-OTU28	KF049038	0,2	JN397867	96	реки Цзин-Мэй и Синь-Диан, Китай	<i>Ca.</i> <i>'Methanoperedens</i> <i>sp.'</i> GOM Arc I
KL-16S-OTU29	KF049039	0,2	AJ583384	96	грунтовые воды, Сибирь, Россия	<i>Methanosaeta sp.</i>
KL-16S-OTU30	KF049040	0,2	KF360015	98	Тибетское нагорье, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU31	KF049041	0,2	LN796323	99	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-16S-OTU32	KF049042	0,2	LN796016	96	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Ca.</i> <i>'Methanoperedens</i> <i>sp.'</i> GOM Arc I
KL-16S-OTU33	KF049043	0,2	KC604461	97	водохранилище Махомет, Иллинойс	<i>Methanosaeta sp.</i>
KL-16S-OTU34	KF049044	0,2	DQ869366	94	кислые субарктические торфяные почвы, Сибирь, россия	<i>Methanosarcina sp.</i>
KL-16S-OTU35	KF049045	0,7	HE796507	100	озеро Muntany	Marine Benthic group D and DHVEG-1
KL-16S-OTU36	KF049046	3,1	JN649111	100	торфяники, Аппалачи	<i>Methanocella sp.</i>
KL-16S-OTU37	KF049047	1,9	DQ310446	99	река Макензи, западная Канада	<i>Woeseearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU38	KF049048	0,2	DQ310440	99	река Макензи, западная Канада	<i>Woeseearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU39	KF049049	4.0	KM273677	97	рисовники, Италия	<i>Woeseearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU40	KF049050	1,4	FM165705	94	рисовники, Китай	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-16S-OTU41	KF049051	2,4	EU110047	100	озеро Цинхай, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3

KL-16S-OTU42	KF049052	0,2	GQ150034	100	луговые почвы, Тибетское нагорье	<i>Thaumarchaeota</i> , Soil Crenarchaeotic Group
KL-16S-OTU43	KF049053	1.0	JQ724813	99	низкотемпературный источник	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU44	KF049054	1,4	JF412486	98	UASB биореактор	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU45	KF049055	0,5	KT025831	99	бензолиспользующая метаногенная накопительная культура	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU46	KF049056	1.0	EU244257	88	река Макензи, западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU47	KF049057	0,2	JQ724807	89	низкотемпературный источник	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU48	KF049058	0,5	JN853653	95	озеро Киву, Центральная Африка, глубина 157 м	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU49	KF049059	0,5	JN649253	99	торфяники, Аппалачи	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-16S-OTU50	KF049060	0,2	EU244272	95	река Макензи и море Бофорта, западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU51	KF049061	0,2	KT583762	100	пещера Са-Бенту, Сардиния, Италия	<i>Thaumarchaeota</i> , Soil Crenarchaeotic Group
KL-16S-OTU52	KF049062	0,5	KU297834	99	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Thaumarchaeota</i> , Group C3
KL-16S-OTU53	KF049063	0,2	HQ692929	91	рисовники, Китай	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU54	KF049064	0,2	DQ310443	98	река Макензи, западная Канада	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU55	KF049065	0,2	EF639571	99	озеро Пончартрейн, США	<i>Thaumarchaeota</i> , group C3
KL-16S-OTU56	KF049066	0,2	LN796333	96	грунтовые воды, Беркаут, Нидерланды	<i>Ca. 'Methanoperedens', GOM Arc I</i>

KL-16S-OTU57	KF049067	0,2	JN853653	93	озеро Киву, Центральная Африка, глубина 157 м	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU58	KF049068	0,2	EU244257	90	озеро Маккензи, Австралия	<i>Woesearchaeota</i> (DHVEG-6)
KL-16S-OTU59	KF049069	0,2	KF800016	97	Тибетское нагорье	<i>Methanosaeta</i> sp.

Приложение 2 . Результаты BLAST для последовательностей *mcrA* гена

ОТЕ	Номер GenBank	Ближайший родственник	Сходство, %	Источник выделения	Таксономическая принадлежность
KL-mcrA-OTU0	AGU01548	ADY16721	99	Лесные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU1	AGU01549	ALB48939	99	подледниковые отложения, восточная Антарктида	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU2	AGU01550	AIB53924	99	Термокарстовый пруд, сфагновый торф	<i>Methanobacterium</i> sp.
KL-mcrA-OTU3	AGU01551	ARO50374	96	Цинхай-Тибетское нагорье, Китай	<i>Methanobacterium</i> sp.
KL-mcrA-OTU4	AGU01552	AHB61232	99	Речное русло	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU5	AGU01553	ADY16721	99	Лесные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU6	AGU01554	CCG47729	98	Альпийские почвы	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU7	AGU01555	ABX75055	99	Тибетское нагорье	<i>Ca. Methanoperedens</i> sp.'
KL-mcrA-OTU8	AGU01556	CCU55320	97	Морские отложения	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU9	AGU01557	AGC53983	100	Отложения, Китай	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU10	AGU01558	ACF16854	97	Осушенные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU11	AGU01559	AHG52768	100	Анаэробный биореактор	<i>Ca. Methanoperedens</i> sp.'
KL-mcrA-OTU12	AGU01560	AGS51105	96	Гуминовые озерные отложения, озеро Роуз	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU13	AGU01561	AGC54162	99	отложения, Китай	<i>Methanocellales</i>

KL-mcrA-OTU14	AGU01562	AGS51092	96	Гуминовые озерные отложения, озеро Роуз	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU15	AGU01563	AHB61233	97	Речное русло	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU16	AGU01564	ACF16854	94	Осушенные почвы	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU17	AGU01565	CCG47729	96	Альпийские почвы	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU18	AGU01566	AFI42263	98	Отложения эстуария	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU19	AGU01567	AGC54162	99	Отложения, Китай	<i>Methanocella</i> sp.
KL-mcrA-OTU20	AGU01568	ALF38207	99	Озерные отложения	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU21	AGU01569	ALT20348	96	Торфяные почвы таежных лесов	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU22	AGU01570	AGS50916	97	Гуминовые озерные отложения, Mary Lake	<i>Methanoregulaceae</i>
KL-mcrA-OTU23	AGU01571	AGS50710	95	Гуминовые озерные отложения (США)	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU24	AGU01572	AHG52768	99	Анаэробный биореактор	<i>Ca. 'Methanoperedens</i> sp.'
KL-mcrA-OTU25	AGU01573	CCU55320	97	Морские отложения	<i>Methanosarcina</i> sp.
KL-mcrA-OTU26	AGU01574	ABX75059	99	Тибетское нагорье	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU27	AGU01575	ACY40858	99	Гуминовые озерные отложения	<i>Methanoregula</i> sp.
KL-mcrA-OTU28	AGU01576	AHY00248	97	Водохранилище с высокой концентрацией мышьяка	<i>Ca. 'Methanoperedens'</i> sp.

KL-mcrA-OTU29	AGU01577	AAK16840	99	Рисовники	<i>Ca. 'Methanopereden s' sp.</i>
KL-mcrA-OTU30	AGU01578	AAK16840	98	Рисовники	<i>Ca. 'Methanopereden s' sp.</i>
KL-mcrA-OTU31	AGU01579	AHY02462	99	Пресноводные болота	<i>Methanobacterium sp.</i>
KL-mcrA-OTU32	AGU01580	CCG47729	95	Альпийские почвы	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-mcrA-OTU33	AGU01581	AHB61234	96	Речное русло	<i>Methanosaeta sp.</i>
KL-mcrA-OTU34	AGU01582	AGS51082	97	Гуминовые озерные отложения, озеро Роуз	<i>Methanoregula sp.</i>
KL-mcrA-OTU35	AGU01583	ALS46627	98	Вечная мерзлота	<i>Ca. 'Methanopereden s' sp.</i>
KL-mcrA-OTU36	AGU01584	AHY02668	100	Пресноводные болота	<i>Methanocella sp.</i>
KL-mcrA-OTU37	AGU01585	AHY02462	99	Пресноводные болота	<i>Methanobacterium sp.</i>