

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА РАСПРОСТРАНЕНИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ И ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ ИЗ МЕСТ ВЫТАИВАНИЯ МЕРЗЛОТНЫХ СЛОЕВ

© 2016 г. Д. А. Складнев^{а, *}, А. Л. Мулюкин^а, С. Н. Филиппова^а, Е. Е. Куликов^а, М. А. Летарова^а,
Е. А. Юзбашева^с, Э. А. Карнышева^б, А. В. Брушков^б, В. Ф. Гальченко^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва

^бКафедра геокриологии, геологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

^сГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва

*e-mail: skladda@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2015 г.

Предложен метод комплексной оценки динамики распространения клеток микроорганизмов и фаговых частиц при вытаивании сезонно-талого слоя реликтового жильного льда. Представлены результаты натурно-лабораторных исследований, проведенных в районе термоцирка в верхней части обнажения пермафроста Мамонтовой горы (Якутия, РФ). Для повышения достоверности результатов, суспензии двух видов микроорганизмов и двух видов колифагов как биомаркеров вносили непосредственно на поверхность вытаивающего льда и в поток талой воды. Показано, что каждый из четырех различающихся модельных биологических объектов: а) характеризуется собственными параметрами перемещения в потоке ручейной воды; б) способен преодолеть вместе с ручейной водой расстояние 132 м за 25–35 мин.

Ключевые слова: Арктика, пермафрост, реликтовый жильный лед, вытаивание, перемещение микроорганизмов и фаговых частиц, методы исследования

DOI: 10.7868/S0026365616050165

Исследование посвящено отработке методических приемов для изучения распространения микроорганизмов и фаговых частиц в зонах вытаивания льдов вечной мерзлоты. Эффективный мониторинг пространственного и временного распространения любых микробных объектов, в том числе и болезнетворных, при оттаивании вечной мерзлоты Арктики безусловно актуален, особенно в условиях потенциального глобального потепления климата.

Микроорганизмы экологических ниш приполярных районов, в частности, обнаруживаемые в толще льдов, вызывают особенный интерес, поскольку в условиях, способствующих длительному хранению клеток и фаговых частиц, могут сохраняться в жизнеспособном состоянии очень древние формы (Gilichinsky et al., 2007; Мельников и соавт., 2011; Wilhelm et al., 2011; Meiring et al., 2012). Практически все микробиологические исследования приполярных эконисш посвящены установлению таксономического состава соответствующих микробных сообществ (Junge et al., 2002; Steven et al., 2006; Segawa et al., 2011; Филиппова и соавт., 2013), а также определению

молекулярных механизмов сохранения биоструктур в условиях замораживания (Mitova et al., 2005; Papa et al., 2009; Merlino et al., 2010; Piette et al., 2010; Satory et al., 2011; Кряжевских и соавт., 2013). В отобранных пробах чаще всего оценивают численность и разнообразие культивируемых аэробных гетеротрофных микроорганизмов, используя микробиологические и молекулярно-генетические методы идентификации (Мулюкин и соавт., 2002; Williamson et al., 2007; Кряжевских и соавт., 2012; Мулюкин и соавт., 2014). Вместе с тем существует возможность перемещения клеток микроорганизмов и фаговых частиц с водными и воздушными потоками как по поверхности, так и по капиллярам и трещинам при оттаивании вечномерзлых отложений и жильных льдов.

Целью данного исследования было разработать метод оценки динамики распространения микроорганизмов и фагов, вытаивающих из льда вечной мерзлоты, с использованием биологических маркеров, вносимых непосредственно в зоне таяния. Постулировалось, что закономерности распространения биомаркеров и компонентов природной микробиоты оттаивающих льдов



Рис. 1. Схематическое изображение участка проведения модельного эксперимента. Точки внесения маркерных биообъектов: подножие ледяной жилы (точка 1), исток ручья из сборного водоема (точка 2). В точке 1 вносили суспензии дрожжей *Y. lipolytica* и колифага G7C. В точке 2 вносили суспензии актинобактерий *Dietzia* Л18 и колифага 9G. Пробы ручейной воды для анализа наличия внесенных маркерных биообъектов отбирали в точках 2–4. В скобках указано расстояние между соседними точками отбора проб.

аналогичны. Подобные исследования важны в отношении малоизученных районов российской Арктики в связи с намеченными обширными планами интенсивного использования приполярных зон России в хозяйственной и оборонной деятельности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологические маркеры. В качестве биологических маркеров использовали два вида микроорганизмов и два вида колифагов. Эукариотным маркером был специально сконструированный штамм непатогенных аскомицетных дрожжей *Yarrowia lipolytica* Y-3603 (Scioli et al., 1997; Yuzbashva et al., 2011; Zinjarde et al., 2014). Клетки *Y. lipolytica* Y-3603 генетически маркированы внесением структурного гена красного флуоресцентного белка TurboFP635, ковалентно связанного с поверхностным белком клеточной стенки YIPir1. В лабораторных условиях наличие клеток *Y. lipolytica* Y-3603 в пробах ручейной воды определяли двумя независимыми методами: 1) по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве на LB-агаре с ампициллином, канамицином и тетрациклином, не препятствующих росту маркерного штамма; 2) по наличию красных флуоресцирующих клеток методом флуоресцентной

микроскопии (микроскоп Axioplan, “Carl Zeiss”, Германия).

В качестве второго маркера использовали выделенный в чистую культуру изолят актинобактерий – штамм Л18, полученный ранее из образца древнего жильного льда Мамонтовой горы (экспедиция 2012 г.). Изолят Л18 отличался хорошим ростом на полноценной среде LB и устойчивостью к неблагоприятным воздействиям. По данным анализа 16S рРНК, штамм Л18 был отнесен к роду *Dietzia* и обнаружил высокое сходство (99%) с представителями трех видов этого рода: *D. natronolimnaea*, *D. dagingensis*, *D. psychrocaliphila* (Korner et al., 2009). Количество клеток актинобактерий *Dietzia* sp. Л18 определяли в пробах по количеству колоний специфического морфотипа, имеющих розовую пигментацию, при посевах на полноценную агаризованную среду LB. Повторность определений численности жизнеспособных клеток 3–5-кратная при постановке 2–3 независимых серий опытов.

В работе использовали два существенно различающихся бактериофага, имеющих узкий круг энтеробактерий-хозяев. Фаг G7C образует четкие негативные колонии на газоне *Escherichia coli* 4s (Kulikov et al., 2012). Второй фаг 9G на газоне другого штамма *E. coli* С600 образует мелкие негативные колонии. Численность фаговых частиц в супернатантах природных проб (после отстаивания в течение 1 ч) определяли подсчетом негативных колоний (БОЕ). Титрование супернатантов проб проводили на газонах обоих штаммов-хозяев в пяти повторностях.

Полевые эксперименты проводили в районе Мамонтовой горы, Центральная Якутия (Мельников с соавт., 2011). Маркерные микроорганизмы и бактериофаги вносили в двух точках: верхняя точка – у подножья слоя обнажения вытаявающего льда, вторая точка – у истока ручья из сборного водоема, сформированного вытаявающей водой (рис. 1, точки 1 и 2).

Образцы биомаркеров для внесения в зону вытаявания льда вечной мерзлоты приготавливали непосредственно на месте внесения путем ресуспендирования в ручейной воде привезенных свежих высококонцентрированных микробных и фаговых препаратов. Образец для внесения в точку 1 (общий объем 2500 мл) содержал клетки дрожжей *Y. lipolytica* (1150 г) и 200 мл суспензии частиц фага G7C (10^{11} БОЕ/мл). Образец для внесения в точку 2 (общий объем 500 мл), содержал 100 мл суспензии клеток актинобактерий *Dietzia* sp. Л18 (4.8×10^8 КОЕ/мл) и 200 мл суспензии частиц фага 9G (10^{11} БОЕ/мл).

Скорость распространения маркерных биологических объектов оценивали по их количеству в отбираемых с определенными временными интервалами пробах ручейной воды. Три точки отбора проб располагались на основном русле ручья,

на удалении одна от другой от 23 до 77 м (рис. 1, точки 2, 3, 4). Всего было отобрано 28 проб ручейной воды. Пробы ручейной воды отбирали в стерильные пластиковые пробирки (50 мл) с крышками. Четыре контрольные пробы ручейной воды в каждой из точек отбирали до внесения биообъектов. Все пробы хранили и транспортировали при температуре не выше 12°C. Детекцию маркерных биологических объектов в пробах проводили через 3 сут в лабораториях ФИЦ Биотехнологии РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание участка полевых экспериментов. Наиболее выраженные участки обнажений жильного льда вечной мерзлоты в районе Мамонтовой горы находятся на берегу реки Алдан. В обнажении третьей террасы вскрываются аллювиальные отложения, с начала квартала заполнявшие Нижнеалданский прогиб, развитый вдоль зоны сочленения Предверхоанского краевого прогиба с Сибирской платформой. В нижней части разреза вскрываются пески и супеси среднеплейстоценового возраста. Они содержат частые горизонтальные прослойки пойменных супесей, хорошо увлажненных за счет льда-цемента. Выше залегает ледовый комплекс с мощными ледяными жилами позднеплейстоценового и голоценового возраста. Геологические данные показывают, что похолодание и связанное с ним промерзание отложений началось здесь в конце плиоцена (порядка 2.5–1.8 млн лет назад). Криолитологические индикаторы – жильные льды, залегающие выше по разрезу, свидетельствуют об отсутствии протаивания мерзлой толщи в голоценовый оптимум (Мельников с соавт., 2011).

В результате протаивания сезонно-талого слоя реликтового льда вблизи ледяной жилы существует водоем, в котором талая вода застаивается, а затем в виде ручейных потоков попадает в реку Алдан (рис. 1). Соответственно, для вытравливающих микроорганизмов и фаговых частиц четко различаются два этапа распространения: (1) от поверхности льда вместе с талой водой до сборного водоема, и (2) от этого водоема по ручью до реки Алдан. Для измерения скорости перемещения на этих двух этапах была выбрана схема внесения двух пар различных биомаркеров в двух независимых точках (рис. 1, точки 1 и 2). Биомаркеры, внесенные в точке 1, имели возможность преодолеть максимальное расстояние (132 м) от обнаженного льда до реки Алдан, а при внесении в точке 2 – могли перемещаться только в пределах ручья (109 м).

Важно отметить, что в работе было учтено обязательное требование к культурам вносимых биомаркеров: они не должны нарушать видовой состав природной биоты исследуемого района.

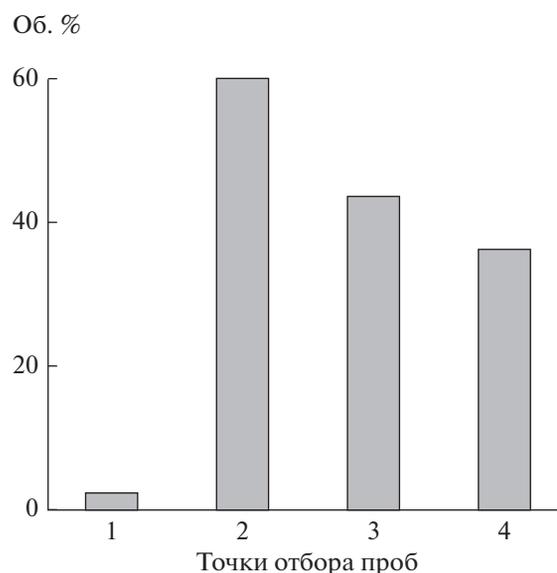


Рис. 2. Объемная доля нерастворимых компонентов в пробах ручейной воды, отобранных в ходе эксперимента.

Соответственно, нами были выбраны четыре экологически безопасных и существенно различающихся биологических объекта: непатогенные дрожжи *Y. lipolytica*, изолят актинобактерий рода *Dietzia* (ранее выделенный из исследуемой криозоны) и два вида четко различимых колифагов.

Предварительные замеры расхода воды в ручье показали следующие значения: 4 л/мин в верхней части потока (точка 2) и 6 л/мин в нижней (точка 3). Скорость потока ручейной воды в точке 3 составляла 1 м/с. Была отмечена выраженная неравномерность потока, скорее всего, связанная с возможностью формирования временных затворов из-за скопления песка, глины и фрагментов растительности.

Поскольку ручейная вода отличалась высоким содержанием нерастворимых компонентов, провели определение объемной доли осадков в отобранных пробах воды (рис. 2). Максимальная объемная доля осадков (60 об. %) наблюдалась в пробах, отобранных в месте разлива ручья из сборного водоема (точка 2) и снижалась по мере приближения к реке Алдан (до 37 об. %). В воде, вытравливаемой из льда пермафроста (точка 1), объемная доля осадков была минимальна (2 об. %).

Рассмотрим распределение жизнеспособных клеток или вирусных частиц в отобранных пробах для каждого из четырех модельных биологических объектов.

Перемещение модельных биологических объектов, внесенных на поверхность ледяной жилы (в точке 1). Исходная суспензия клеток *Y. lipolytica* до

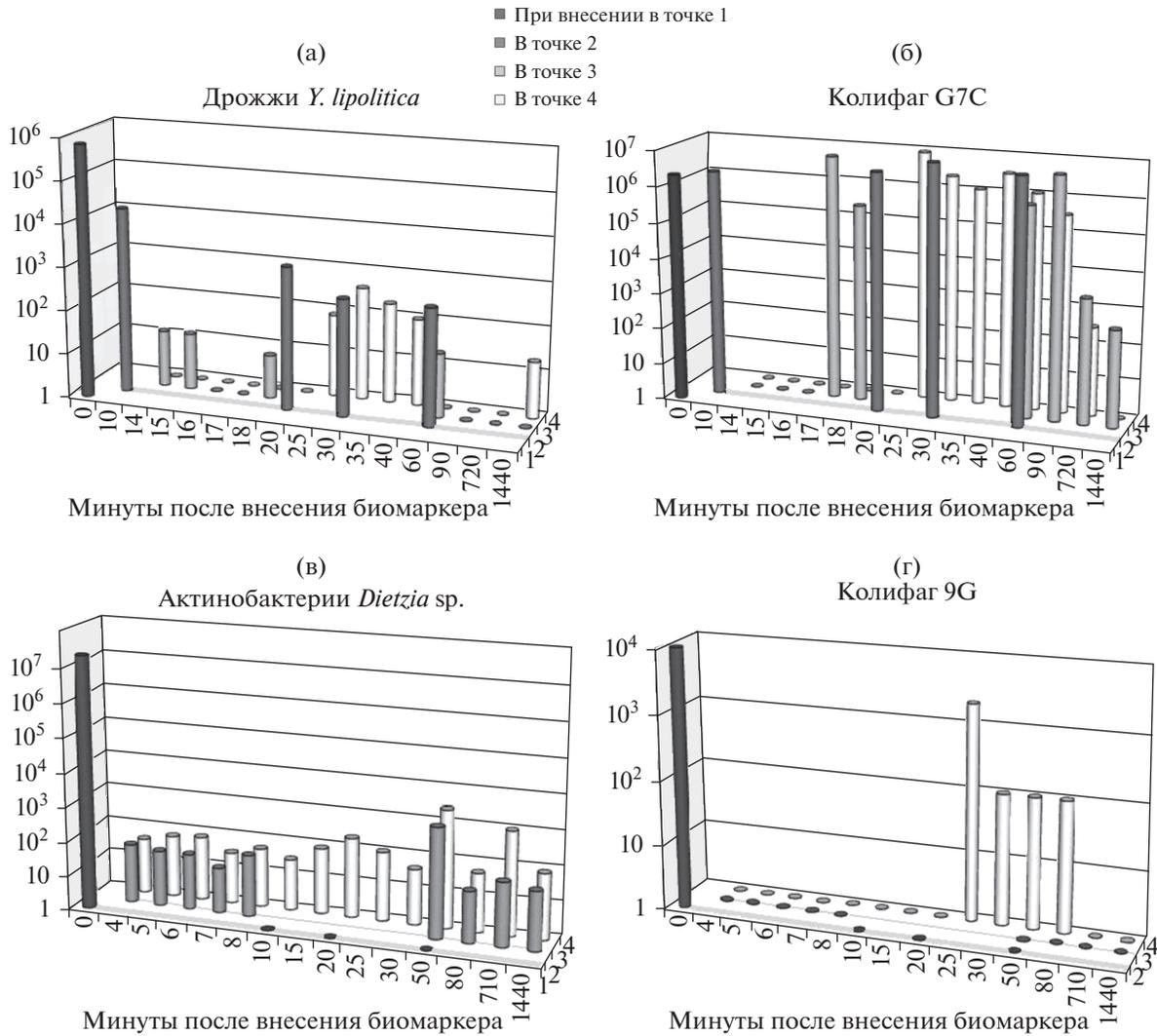


Рис. 3. Содержание жизнеспособных клеток (а, в; КОЕ/мл) и активных фаговых частиц (б, г; БОЕ/мл) в пробах воды, отобранных в точках 1–4. Указаны интервалы между моментами внесения биомаркеров (время “0”) и моментом отбора пробы.

внесения на поверхность льда в точке 1 содержала порядка 10^6 КОЕ/мл (рис. 3а). Первая проба воды в точке 2 у разлива ручья из сборного водоема на расстоянии 23 м от точки внесения была отобрана через 10 мин после начала эксперимента. В последовательно отбираемых из точки 2 пробах наблюдали выраженную убыль концентрации клеток дрожжей: через 10 мин – 2×10^3 КОЕ/мл, через 30 мин – 5×10^2 КОЕ/мл, что указывает на относительно быстрое распределение клеток биомаркера по объему сборного водоема. При перемещении по ручью дрожжи также рассеивались в потоке, о чем судили по снижению их титра в пробах 3 и 4, отобранных в среднем течении ручья (точка 3:

$(1-3) \times 10^1$ КОЕ/мл; точка 4: $(1-3) \times 10^1$ КОЕ/мл). Весь путь 132 м от точки внесения (точка 1) до нижней точки отбора проб (точка 4) слабо выраженное “пятно” маркированных дрожжевых клеток прошло за 30–35 мин. Анализ проб ручейной воды, отобранных через 24 ч после внесения *Y. lipolytica*, показал наличие жизнеспособных клеток дрожжей в низкой концентрации только в пробе из точки 4 (рис. 3а).

Суспензию колифага G7C вносили непосредственно на лед (вместе с клетками *Y. lipolytica*) в концентрации 2×10^6 БОЕ/мл. В пробах, отбираемых в разливе в течение 60 мин, титр колифага G7C практически не изменялся: через 10 мин после внесения

в точке 2 обнаруживалось 4×10^6 БОЕ/мл, через 30 мин – 9×10^6 БОЕ/мл, через 60 мин – 6×10^6 БОЕ/мл (рис. 3б). Таким образом, содержание фаговых частиц в сборном водоеме, в отличие от маркерных дрожжей, очень стабильное.

Основное маркерное “пятно”, содержащее максимальное число фаговых частиц, перемещалось по ручью пропорционально скорости потока по уклону берега, поскольку из точки 2 в точку 3 (расстояние 77 м) “пятно” пришло за 7 мин, а в точке 4 (расстояние 32 м) было обнаружено еще через 8 мин. Весь путь от точки внесения у подножья ледяного обнажения (точка 1) до нижней точки отбора проб (точка 4, общая удаленность 132 м) “пятно” частиц колифага G7C прошло за 25–30 мин. Снижение концентрации активных фаговых частиц в пробах, отобранных в нижних точках 3 и 4, наблюдается только через 12 ч. В целом, маркерные биообъекты с существенно различающимися массой и объемом (дрожжи *Y. lipolytica* и колифаг G7C) перемещались с практически одинаковой скоростью.

Перемещение модельных биологических объектов, внесенных в излив ручья (в точке 2). Численность бактериального маркера – актинобактерий *Dietzia* sp. Л18, внесенных в точку 2, определяли по числу колоний с характерной формой и пигментацией в посевах проб на агаризованной среде LB. Для определения фонового уровня присутствия аборигенных таксономически и фенотипически близких бактерий проводили анализ отобранных контрольных проб. Подсчет характерных пигментированных колоний показал присутствие природного фона актинобактерий в нижнем течении изучаемого ручья в концентрации $(1-7) \times 10^1$ КОЕ/мл. Поскольку приготовленная для внесения в ручей суспензия клеток *Dietzia* sp. Л18 содержала порядка 5×10^8 КОЕ/мл, перемещение “пятна” внесенных маркерных актинобактерий удалось достоверно наблюдать на фоне аборигенных актинобактерий (рис. 3в). Путь от начала ручья (точка 2) до нижней точки отбора проб (точка 4, общая удаленность 109 м) слабо выраженное бактериальное “пятно” прошло за 30 мин. Через 30 мин в точке 4 наблюдали второй, более выраженный пик наличия маркерных клеток – $(2-3) \times 10^3$ КОЕ/мл. Подобный характер перемещения клеток актинобактерии *Dietzia* может указывать на возможность их ассоциации (адсорбции) на неких подвижных компонентах в потоке вытекающей воды.

Использование в качестве биомаркера колифага 9G дало минимальную информацию. Прежде всего, концентрация суспензии фаговых ча-

стиц еще до внесения в ручей резко снизилась до 2×10^4 БОЕ/мл (рис. 3г). Тем не менее, путь от точки внесения в начале ручья (точка 2) до точки 4 слабо выраженное “пятно” вирусных частиц прошло за 25 мин. При этом отметим полное отсутствие активных частиц колифага 9G во всех пробах, отобранных в точке 3, тогда как они присутствовали в пробах из точки 4, расположенной ниже по течению ручья. Можно предположить, что частицы колифага 9G концентрируются в нижнем течении ручья как сорбированные на неких природных структурах.

Предложенный оригинальный метод, основанный на использовании комплекса биологических маркеров, вносимых в природную зону, где наблюдается вытаявание вечной мерзлоты, позволил провести оценку скорости распространения микроорганизмов и вирусных частиц с потоком талой воды. Обязательным условием при выборе маркерных биологических объектов является их экологическая безопасность для изучаемого биоценоза, в том числе для аборигенной микробиоты.

Полученные данные продемонстрировали, во-первых, способность всех биомаркеров преодолеть вместе с талой водой достаточно протяженное расстояние (132 м) за ограниченное время (25–35 мин), во-вторых, наличие у каждого из биологических объектов собственных характеристик перемещения в потоке талой воды. В-третьих, были выявлены достоверные различия в характере распространения биомаркеров, внесенных на тающий мерзлотный лед выше сборного водоема и точке излива талой воды из него. Анализ полученных данных позволил сделать предварительное заключение о том, что в значительной степени распространение биологических микроскопических объектов (и, возможно, их выживаемость) в потоках талой воды пермафроста в естественных экологических условиях определяются степенью их адсорбции на структурных элементах потоков. Соответственно, целесообразно получить информацию о динамике перемещения в потоках талой воды самих структурных нерастворимых компонентов как переносчиков адсорбированных на них клеток микроорганизмов и вирусных частиц.

Динамика перемещения и распределение в потоке жизнеспособных частиц колифагов G7C и 9G, внесенных выше сборного водоема и на выходе из него, существенно различалась. Концентрация частиц 9G практически сразу после их внесения в ручейную воду упала до номинального обнаруживаемого уровня. Напротив, колифаг G7C, внесенный непосредственно на лед, обнаруживался в неизменно высокой концентрации как во всех пробах из сборного водоема, так и в

ручейных пробах, в том числе, отобранных через 24 ч после внесения. В целом, можно заключить, что суспензии частиц колифагов удобны для использования в качестве маркерных биообъектов в мониторинговых исследованиях.

Аналогичное заключение можно сделать относительно впервые использованного для экологических исследований штамма непатогенных дрожжей *Y. lipolytica* Y-3603, маркированных геном красного флуоресцентного белка. Дополнительным преимуществом штамма Y-3603 является возможность оценивать не только фенотипические признаки его колоний, но и применять высокоселективную среду. Способность маркерного штамма Y-3603 к росту на среде с добавлением ампициллина, канамицина и тетрациклина обеспечивала достоверность обнаружения клеток именно этого биомаркера в отбираемых пробах с поверхности вытаивающего льда до реки Алдан.

Интерес к использованию в настоящем исследовании актинобактерии *Dietzia* sp. Л18, определялся тем, что она представляла собой компонент микробиоты древнего жильного льда (неопубликованные данные) и была выделена из проб оттаивающего льда, отобранных в этом районе Мамонтовой горы. Использование высокой концентрации клеток во внесенном препарате, во-первых, позволило оценить динамику их перемещения в вытаивающей воде даже на фоне заметного уровня аборигенных актинобактерий в потоке ручейной воды, во-вторых, подтвердило вывод о возможном влиянии на перемещение микроорбъектов в водном потоке их сорбированного или планктонного состояния. Отметим, что для дальнейшего использования пигментированных актинобактерий целесообразно использовать генетически маркированные штаммы.

Анализ полученных данных позволил сделать следующие выводы.

Каждый из четырех маркерных биологических объектов имеет собственные характеристики перемещения в потоке талой воды. Наличие сборного водоема на пути талой воды определяет успешность адсорбции биологических объектов на нерастворимых компонентах потока. Информация о перемещениях таких компонентов может дать дополнительный материал о динамике перемещения вытаивающих микробных клеток и вирусных частиц.

Сравнение динамики перемещения и распределение жизнеспособных частиц колифагов G7C и 9G, внесенных до попадания в сборный водоем и на разливе из него, показывает, что только в первом случае в течение 24 ч колифаг присутствует в

исследуемом потоке, тогда как во втором случае концентрация упала до номинально обнаружимого уровня практически сразу после внесения. Отсюда следует необходимость внимательного учета и мониторингового обследования всех встречающихся на пути потоков сборных водоемов как ниш накопления вытаивающих биообъектов.

В целом, следует констатировать целесообразность применения нового комплексного метода биологического маркирования для мониторинга распространения вытаивающей микробиоты в талых потоках, а также необходимость развития исследований в этом направлении. В частности, необходимо развивать изучение связи между способностью латеральных поверхностных перемещений микробиологических объектов (клеток и фаговых частиц) с их сорбцией на структурных минеральных элементах потоков.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 44 “Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации” (руководитель научного проекта В.Ф. Гальченко) и при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России с использованием УНУ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (уникальный идентификатор проекта RFMEFI59214X0002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Манучарова Н.А., Соина В.С., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 474–485.
- Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Manucharova N.A., Soina V.S., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Reactivation of dormant and nonculturable bacterial forms from paleosoils and subsoil permafrost // Microbiology. 2012. V. 81. № 4. P. 435–445.
- Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лоико Н.Г., Баслеров Р.В., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii*, выделенных из вечномерзлотных осадочных пород, и аналогов коллекционных штаммов // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 27–41.
- Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Baslerov R.V., Kolganova T.V., Soina V.S., Manucharova N.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Comparison of the adaptive potential of the *Arthrobacter oxydans* and *Acinetobacter lwoffii* isolates from permafrost sedimentary rock and the analogous collection strains // Microbiology. 2013. V. 82. № 1. P. 29–42.

- Мельников В.П., Рогов В.В., Курчатова А.Н., Брушков А.В., Грива Г.И. Распределение микроорганизмов в мерзлых грунтах // Криосфера Земли. 2011. Т. XV. № 4. С. 86–90.
- Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Воробьева Е.А., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Применение метода рентгеновского микроанализа для выявления и предварительной оценки физиологического состояния микроорганизмов в объектах окружающей среды // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 836–848.
- Mulyukin A.L., Sorokin V.V., Vorob'eva E.A., Suzina N.E., Duda V.I., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Detection of microorganisms in the environment and the preliminary appraisal of their physiological state by X-ray microanalysis // Microbiology. 2002. V. 71. № 6. P. 723–734.
- Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Манучарова Н.А., Акимов В.Н., Андерсен Д., МакКэй К., Гальченко В.Ф. Прокариотное сообщество подледниковых грунтов антарктического озера Унтерзее: выявление культуральными и прямыми микроскопическими методами // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 215–224.
- Mulyukin A.L., Demkina E.V., Manucharova N.A., Akimov V.N., Andersen D., McKay C., Gal'chenko V.F. The prokaryotic community of subglacial bottom sediments of Antarctic lake Untersee: detection by cultural and direct microscopic techniques // Microbiology. 2014. V. 83. № 1–2. P. 77–84.
- Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Куликов Е.Е., Сорокин В.В., Акимов В.Н., Бейдж А.К., МакКей К., Андерсен Д., Гальченко В.Ф. Обнаружение фагов в популяции бактерий озера Унтерзее (Антарктида) // Микробиология. 2013. Т. 82. № 3. С. 383–386.
- Filippova S.N., Surgucheva N.A., Kulikov E.E., Sorokin V.V., Akimov V.N., Bej A.K., McKay C., Andersen D., Gal'chenko V.F. Detection of phage infection in the bacterial population of Lake Untersee (Antarctica) // Microbiology. 2013. V. 82. № 3. P. 366–369.
- 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. № 2. P. 275–311.
- Junge K., Imhoff F., Staley T., Deming J.W. Phylogenetic diversity of numerically important Arctic sea-ice bacteria cultured at subzero temperature // Microb. Ecol. 2002. V. 43. № 3. P. 315–328.
- Piette F., D'Amico S., Struvay C., Mazzucchelli G., Renaut J., Tutino M.L., Danchin A., Leprince P., Feller G. Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // Mol. Microbiol. 2010. V. 76. № 1. P. 120–132.
- Koerner R.J., Goodfellow M., Jones A.L. The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunist pathogens // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2009. V. 55. P. 296–305.
- Kulikov E.E., Kropinski A.M., Golomidova A., Lingohr E., Govorun V.M., Serebryakova M., Prokhorov N., Letarova M.A., Manykin A., Strotskaya A., Letarov A. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB_EcoP_G7C // Virology. 2012. V. 426. P. 93–99.
- Merlino A., Russo K.I., Castellano I., De Vendittis E., Rossi B., Conte M., Vergara A., Sica F. Structure and flexibility in cold-adapted iron superoxide dismutases: the case of the enzyme isolated from *Pseudoalteromonas haloplanktis* // J. Struct. Biol. 2010. V. 172. № 3. P. 343–352.
- Mitova M., Tutino M.L., Infusini G., Marino G., De Rosa S. Exocellular peptides from Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* // Mar. Biotechnol. (NY). 2005. V. 7. № 5. P. 523–531.
- Papa R., Rippa V., Duilio A. Identification of the transcription factor responsible for L-malate-dependent regulation in the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 295. № 2. P. 177–186.
- Satory D., Gordon A.J.E., Halliday J.A., Christophe H. Epigenetic switches: can infidelity govern fate in microbes? // Curr. Opin. Microbiol. 2011. V. 14. P. 212–217.
- Scioli C., Vollaro L. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters // Water Res. 1997. V. 31. № 10. P. 2520–2524.
- Segawa T., Yoshimura Y., Watanabe K., Kanda H., Kohshima S. Community structure of culturable bacteria on surface of Gulkana Glacier, Alaska // Polar Sci. 2011. V. 5. P. 41–51.
- Steven B., Léveillé R., Pollard W.H., Whyte L.G. Microbial ecology and biodiversity in permafrost // Extremophiles. 2006. V. 10. № 4. P. 259–267.
- Williamson K.E., Radosevich M., Smith D.W., Wommack K.E. Incidence of lysogeny within temperate and extreme soil environments // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2563–2574.
- Wilhelm R.C., Niederberger T.D., Greer C., Whyte L.G. Microbial diversity of active layer and permafrost in an acidic wetland from the Canadian High Arctic // Can. J. Microbiol. 2011. V. 57. № 4. P. 303–315.
- Yuzbasheva E.Y., Yuzbashev T.V., Laptev I.A., Konstantinova T.K., Sineoky S.P. Efficient cell surface display of Lip2 lipase using C-domains of glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall proteins of *Yarrowia lipolytica* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 91. № 3. P. 645–654.
- Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A.R. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications // Biotechnol. Adv. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.008>

Modeling the Propagation of Microbial Cells and Phage Particles from the Sites of Permafrost Thawing

D. A. Skladnev^{1, *}, A. L. Mulyukin¹, S. N. Filippova¹, E. E. Kulikov¹, M. A. Letarova¹,
E. A. Yuzbasheva³, E. A. Karnysheva², A. V. Brushkov², and V. F. Gal'chenko¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Department of Geokryology, Geographical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

*e-mail: skladda@gmail.com

Received March 20, 2015

Abstract—A method is proposed for integral assessment of the propagation of microbial cells and viral particles during seasonal thawing of relic ice wedge layers. The results of on-site and laboratory investigation carried out in the upper part of permafrost exposure at Mamontova Gora (Yakutiya, Russia) are presented. To increase reliability of the results, suspensions of two microbial species and two coliphage species were introduced as biomarkers directly on the surface of thawing ice and in the meltwater flow. Each of the four different model biological objects was shown to possess unique parameters of movement in the meltwater flow and is able to move 132 m in 25–35 min with the water flow.

Keywords: Arctics, permafrost, relic ice wedge, thawing, propagation of microorganisms and phage particles, investigation methods