

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

**Кольцова
Екатерина Михайловна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ РЕЛИКТОВЫХ
ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Манучарова Наталия Александровна

Москва 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. РОЛЬ ПОГРЕБЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАК ПРИРОДНЫХ ДЕПОЗИТАРИЕВ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ.....	10
1.1. Погребенные местообитания как свидетели эволюции биосферы.....	10
1.2. Жизнь в подповерхностных местообитаниях	17
1.2.1. Изучение глубокопогребенных грунтов и многолетнемерзлых отложений.....	17
1.2.2. Изучение погребенных почв археологических памятников различного возраста	20
1.3. Биотехнологический потенциал погребенных микробных сообществ	26
ГЛАВА 2. ПРОБЛЕМА ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ И ТРУДНОРЕАКТИВИРУЕМЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ	27
2.1. Механизмы образования покоящихся форм прокариот.....	28
2.2. Роль покоящихся форм микроорганизмов в поддержании гомеостаза сообщества	34
2.3. Вывод клеток прокариот из покоящегося состояния в естественных условиях и в условиях лаборатории.....	36
2.4. Биотехнологический потенциал покоящихся форм почвенных микроорганизмов.....	39
ГЛАВА 3. МЕТАГЕНОМИКА КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРУДНОРЕАКТИВИРУЕМЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ	41
3.1. Метагеномика почвенных сообществ	41
3.2. Метагеномика погребенных местообитаний.....	43
3.3. Метагеномика многолетнемерзлых отложений.....	44
ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
4.1. Объекты исследования	46
4.2. Методы исследования.....	48
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60

5.1. Динамика эмиссии диоксида углерода из почв и грунтов при внесении полисахаридов	60
5.2. Динамика общей численности и биомассы микроорганизмов в почвах и грунтах при внесении полисахаридов.....	65
5.3. Метаболически активный микробный комплекс исследуемых почв и грунтов.....	72
5.3.1. Исследование отклика активного микробного комплекса исследуемых почв и грунтов на внесение полисахаридов	72
5.3.2. Идентификация отдельных филогенетических групп активного микробного комплекса и оценка их биомассы.....	78
5.4. Выделение и идентификация доминантов гидролитического сообщества исследуемых почв и грунтов.....	83
5.5. Метагеномный анализ прокариотных микробных сообществ исследуемых почв и грунтов (таксономическая структура сообщества)	88
5.6. Метагеномный анализ прокариотных микробных сообществ исследуемых почв и грунтов (функциональная структура сообщества).....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Использование различных свойств погребенных почв и осадочных пород как индикаторов динамики природной обстановки, привлекает все большее внимание исследователей в связи с разработкой решений теоретических и прикладных проблем изучения и использования природных ресурсов, для оценки возможных последствий глобальных изменений окружающей среды и климата. Проблема познания структурного и функционального разнообразия микробных сообществ объектов криосферы и погребенных палеопочв относится к числу наиболее актуальных, однако слабо изученных аспектов экологии микроорганизмов. Популяции покоящихся клеток в таких местообитаниях гетерогенны по сохранению ими пролиферативного потенциала и способности к реверсии метаболической активности. В связи с этим большой интерес представляет изучение форм и механизмов длительного выживания микробных клеток в природных древних микробных сообществах. Рассматривая микробные сообщества многолетнемерзлых пород, подпочвенных отложений и погребенных почв как естественные природные коллекции микроорганизмов следует особо отметить их пока не исследованный биотехнологический потенциал.

Микроорганизмы являются неотъемлемой динамичной частью подповерхностных местообитаний. Они способны длительное время переносить стрессовые условия окружающей среды и сохраняться в ней долгое время путем перехода в покоящееся состояние. Микроорганизмы, выжившие в этих условиях, интересны в связи с наличием у них эффективных механизмов адаптации и переживания неростовых условий в течение длительных сроков хранения в природе с момента погребения. Актуальным представляется выявление потенциальной активности реликтовых микробных сообществ за счет реактивации пула покоящихся форм бактерий, в том числе некультивируемых, составляющих большую долю сообщества, с целью совершенствования экологического и биотехнологического мониторинга. Уникальность микробного

сообщества при длительной консервации обеспечивается отсутствием притока веществ и доступной влаги. При этом в природе микроорганизмы могут подвергаться консервации в различной степени, в зависимости от условий и времени погребения. За последнее десятилетие появляется все больше информации о роли прокариотных представителей гидролитического комплекса древних микробных сообществ в сохранении жизнеспособного пула в условиях отсутствия притока питательных веществ, тогда как ранее главная роль отводилась эукариотной гидролитической составляющей.

В ряде работ было показано, что характерной особенностью бактериальных клеток микробных сообществ мерзлоты является восстановление их активности после оттаивания образцов. Однако доля прорастающих клеток в них (по числу КОЕ) низка, а в ряде образцов не выявляется в стандартных условиях (КОЕ=0) (Soina и др., 2004; Vorobyova и др., 1997; Vorobyova, Soina, Mulukin, 1996). Для другого типа консервации микроорганизмов в подкурганных степных палеопочвах также показано сохранение клетками жизнеспособности (по КОЕ) (Демкин, Демкина, Борисов, 2005; Хомутова, Демкина, Демкин, 2004).

Для оценки функциональной активности погребенных образцов необходима их адресная инициация питательным субстратом, позволяющая оценить динамику развития ранее законсервированного сообщества. Поскольку в результате длительного погребения происходит потребление всех легкоразлагаемых субстратов, логично предположить естественный отбор штаммов, обладающих способностью к гидролизу труднодоступных субстратов и проводить инициацию микробной сукцессии при помощи сложных трудноразлагаемых полисахаридов. При этом по-прежнему остается открытым вопрос о зависимости структуры и активности гидролитического микробного комплекса от условий окружающей среды. Знание особенностей структуры гидролитического комплекса крайне важно также в практическом аспекте, так как открывает новые перспективы в биотехнологии, биоремедиации и детоксикации экосистем.

Несмотря на проводимую процедуру инициации микробной сукцессии при помощи субстрата, низкий процент жизнеспособных микроорганизмов в погребенных местообитаниях и трудность их реактивации сильно ограничивает возможность характеристики сообществ при помощи методов классической микробиологии (метод культивирования на средах и подсчет методом прямой микроскопии). Доступ к изучению некультивируемых микроорганизмов может быть обеспечен при внедрении молекулярно-биологических методов в микробиологическую практику (Rondon, Goodman, Handelsman, 1999). Применение данных методов позволит наиболее полно определить объем и состав микробных ассоциаций, а также их генетический потенциал.

Цель работы

Целью работы является выявление потенциальной активности и функциональная характеристика гидролитической прокариотной составляющей реликтовых микробных комплексов на примере сообществ погребенных каштановых палеопочв и многолетнемерзлых грунтов.

Задачи исследования

1. Оценка общей активности микробного сообщества по эмиссии диоксида углерода в ходе сукцессии, инициированной увлажнением и внесением субстрата в исследуемые микрокосмы;
2. Определение динамики общей численности клеток и биомассы микроорганизмов в ходе сукцессии, инициированной увлажнением и внесением субстрата;
3. Выявление численности и биомассы метаболически активных клеток и структуры метаболически активного прокариотного микробного сообщества;
4. Исследование филогенетического разнообразия прокариотной составляющей гидролитического комплекса, создание коллекции чистых культур активных микроорганизмов-гидролитиков;
5. Анализ функциональной генетической структуры прокариотной составляющей гидролитического комплекса.

Научная новизна

Сравнительная оценка структуры и физиологического состояния покоящихся гидролитических комплексов микробных сообществ проведена впервые. Впервые применены молекулярно-биологические методы для полной характеристики сообществ погребенных почв и многолетнемерзлых грунтов на уровне родов с учетом некультивируемых форм, а также, проведена полная характеристика сообществ методами метагеномики. Выявлено увеличение потенциальной активности бактериальных сообществ по мере увеличения глубины погребения образцов и наличия фактора мерзлоты. Выявлено, что разложение субстрата выполняется различными группами микроорганизмов в образцах различного возраста. Выявлено, что потенциал к разложению ксенобиотиков увеличивается от современных почв к многолетнемерзлым грунтам.

Научно-теоретическая и практическая значимость исследования

- Характеристика гидролитического микробного сообщества и выявление маркирующих групп гидролитических организмов исследуемых экосистем может служить диагностическим показателем состояния и динамики развития почвенных микробиомов и проводимых ими процессов. Предложенные молекулярно-биологические методы позволяют наиболее полно охарактеризовать сообщества погребенных местообитаний, решив проблему нахождения подавляющего большинства родов в некультивируемой форме.

- Многие мицелиальные и одноклеточные бактерии являются продуцентами ферментов, обладающих активностью в широком диапазоне экологических факторов. Получение активных штаммов микроорганизмов-гидролитиков может быть использовано в биотехнологии.

- Потенциал микробных сообществ погребенных местообитаний к деструкции ксенобиотиков может служить основанием для разработки микробных препаратов для ремедиации загрязненных экосистем.

Выполнение работы поддержано:

- грантом РФФИ №15-29-02499 (2015-2017 гг.) «Почва как природный банк микробного биоразнообразия: новые подходы и актуальные аспекты»
- грантом РФФИ №14-50-00029 (2014-2018 гг.) «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем». Направление "Микроорганизмы и грибы"
- грантом РФФИ №11-04-00931-а (2011-2013 гг.) «Экофизиология гидролитических микробных сообществ наземных экосистем»

Апробация работы

Материалы диссертации опубликованы в 8 научных работах, (3 статьи и 5 тезисов научных конференций). По результатам работы были сделаны сообщения на XIX международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2012», VI съезде Общества почвоведов им. В.В.Докучаева, международной конференции EGU-2014 (Австрия, Вена), 5th Global Congress on Environmental Microbiology-2016 (Атланта, США), 3rd World Congress and Expo on Applied Microbiology-2016 (Дубай, ОАЭ).

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 138 страницах, содержат 9 таблиц, 25 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы (главы 1–3), описания объектов и методов исследования (глава 4), обсуждения результатов исследования (глава 5), заключения и выводов. Список литературы включает 228 источников.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю – Манучаровой Наталии Александровне – за ценные советы по организации экспериментальной работы и дальнейшую помощь в обработке полученного материала, а также помощь при подготовке текста рукописи.

Автор выражает особую благодарность сотрудникам Института Микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН профессору, д.б.н. Г. И. Эль-Регистан и к.б.н. Е.В.Демкиной за предоставление образцов погребенных почв, за постоянную поддержку и конструктивную критику рукописей печатных работ по

теме диссертации, а также сотрудникам Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН Е. В. Караевской и Е. М. Ривкиной за предоставление образцов многолетнемерзлых грунтов и помощь в интерпретации полученных данных.

ГЛАВА 1. РОЛЬ ПОГРЕБЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАК ПРИРОДНЫХ ДЕПОЗИТАРИЕВ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

1.1. Погребенные местообитания как свидетели эволюции биосферы

Палеопочвоведение - это наука, изучающая почвы прошлых геологических эпох (палеопочвы) с целью получения информации об истории развития природной среды.

Одним из главных итогов палеопочвенных исследований является осознание того факта, что современная педосфера представляет собой один из бесчисленных временных срезов, отражающих эволюцию природной среды на протяжении практически всей истории развития Земли. Во все периоды геологической истории почвы являлись преимущественной средой обитания для существовавших в то время форм жизни. Уже на самых начальных этапах ископаемые остатки использовались геологами для разделения и корреляции геологических слоев. Эволюция форм жизни была положена в основу стратиграфического подхода, что со временем привело к формированию биостратиграфии. Погребенные почвы, сопутствующие находкам ископаемых растений и животных, обычно игнорировались вплоть до становления почвоведения как самостоятельной науки.

Палеопочвы (гумусовые слои) в лессах Восточно-европейской равнины были впервые описаны К.М. Феофилактовым (1875), П.Я. Армашевским (1884) и подробно изучены Полтавской экспедицией под руководством В. В. Докучаева (1949). Ф. Леверетт подробно описал Сангамонскую погребенную почву (Sangamon paleosol - аналог микулинского педокомплекса на Русской равнине) в Иллинойсе, США. Огромный вклад в формирование новой научной дисциплины внесли работы К.Д. Глинки (Добровольский, Макеев, 2009). В своей программной работе «Задачи исторического почвоведения» он впервые обосновал значение древних почв для палеоландшафтных реконструкций. Причем это касалось изучения не только погребенных, но и поверхностных реликтовых почв, таких, как латеритные почвы третичного времени. Б.Б.Полынов обосновал основные

направления изучения палеопочв и ввел в научный оборот термин «палеопочвоведение» (Добровольский, Макеев, 2009).

В 1950х годах по мере накопления систематических сведений погребенные почвы были привязаны к стратиграфической шкале, и появилась возможность применять данные о палеопочвах для палеогеографических реконструкций. Началом современного этапа изучения палеопочв можно принять шестидесятые годы XX столетия, когда стали широко применяться методы датирования и анализа минералогического состава.

Согласно определению палеопочвенной комиссии Международного Союза наук о почве, палеопочвы могут быть погребенными (ископаемыми) — buried paleosols (fossil soils), непогребенными (реликтовыми почвами или реликтовыми палеопочвами) — surface paleosols, non-buried paleosols (relict soils or relict paleosols) и эксгумированными (погребенные палеопочвы, ре-экспонированные на дневную поверхность в результате эрозии) — exhumed paleosols (Добровольский, Макеев, 2009).

До недавнего времени находки дочетвертичных палеопочв были крайне редки. Еще реже встречаются полнопрофильные дочетвертичные палеопочвы, и, тем более, сохранившиеся почвенные покровы. Однако свидетелями прошлых эпох почвообразования являются не только полнопрофильные почвы, но и многочисленные и разнообразные мелкие компоненты почв — железистые и карбонатные конкреции, вторичные глинистые минералы, гумусовые и органо-минеральные локусы, раковины и панцири почвообитающих животных и пр. и пр. Химический, минералогический и микроморфологический анализ этих почвенных новообразований (включающих и палеонтологические объекты) дает богатейшую информацию о природных условиях жизни в почве и на почве в прошлые эпохи почвообразования.

Поскольку живое вещество концентрирует легкий изотоп углерода и серы, следы жизнедеятельности фотосинтезирующих организмов можно определить по соотношениям изотопов $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ и $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$. Первые биогенные осадки, обогащенные

углеродом со смещенным изотопным отношением $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ обнаружены в отложениях возрастом 2,4 — 2,5 млрд. лет (Добровольский, Макеев, 2009; Campbell, 1979). Биологические циклы в геохимии серы отмечаются в последние 800 млн. лет. Но самые примитивные формы жизни зафиксированы гораздо раньше. Бурное развитие бактериальной палеонтологии (Добровольский, Макеев, 2009; Заварзин, 1995) резко расширило горизонты древней жизни. Появление первых форм жизни по современным данным оценивается в 3,8 млрд. лет назад. На протяжении половины этого периода жизнь была представлена одноклеточными микроорганизмами. В последнее время в связи с обсуждением проблем происхождения жизни на Земле все больший интерес приобретают примитивные почвы-пленки, возможно формировавшиеся более 3,5 млрд. лет назад на поверхностях горных пород под воздействием микрофлоры, главным образом сине-зеленых водорослей - цианобактерий. Не исключено, что столь древние следы жизни на суше означают, что первые микроскопические формы жизни возникли одновременно как в океане, так и на суше. Микроорганизмы безусловно могли осуществлять процессы архаичного почвообразования. Большинство палеоботаников, палеогеографов и геологов полагает, что в докембрии, кембрии и ордовике суша выглядела еще пустынной, и растительного покрова на ней не было. Господствовали на поверхности суши бактериально-водорослевые пленки, грибы и лишайники (Добровольский, Макеев, 2009; Каратыгин, 1993). Это был «первичный» период эволюции педосферы. Однако биогеохимическая деятельность примитивных форм жизни была очень активной, о чем свидетельствуют мощные древние коры выветривания. G. Retallack (Добровольский, Макеев, 2009; Retallack, 2001) приводит результаты подробного изучения двух докембрийских палеопочв возрастом 2,45 млрд. лет в Онтарио, Канада. Считается, что в раннем протерозое атмосфера была бескислородной. Однако в последнее время анализ состава докембрийских пород обнаруживает несомненные следы воздействия окислительных условий на осадочные отложения начиная с раннего протерозоя (Добровольский, Макеев, 2009; Retallack, 2001).

Таким образом, самые древние из известных палеопочв - «Зеленые Глины» - формировались под воздействием кислородной атмосферы, хотя и с низким содержанием кислорода.

На большей части геологической истории преобладали примитивные почвы. Полнопрофильные почвы начали формироваться в девоне-карбоне, т.е. 400-300 млн. лет назад.

Поскольку почва является основной средой обитания живых существ на земной суше, то изучать эволюцию форм жизни следует лишь в связи с эволюцией почв — в том числе древних почв — палеопочв.

Современные палеонтологические методы это сложная система, включающая в себя палеоботанические методы (спорово-пыльцевой, дендрохронологический, биоморфный анализ и анализ растительных остатков), палеозоологические и палеомикробные методы. В настоящее время установлена взаимосвязь каждого из палеонтологических объектов с определенными типами ландшафта. В настоящее время практически ни одно исследование палеопочв не обходится без применения палеонтологических методов. В этом смысле палеонтологию можно рассматривать как часть палеопочвоведения. Дело в том, что почвы формируются продолжительное время (10^3 — 10^7 лет) и представляют главные эпизоды стабилизации земной поверхности — перерывы в осадконакоплении и денудации. В геологических толщах палеопочвы и палеонтологические объекты чаще всего пространственно совпадают, за исключением тех случаев, когда растительные или животные остатки залегают не *in situ*. Среди многочисленных физических, химических и биологических функций, осуществляемых почвой, для палеонтологии особенный интерес представляет функция сохранения памяти о природных условиях прошедших исторических и геологических эпох, в которых формировались древние и погребенные почвы — палеопочвы.

Роль палеопочв как стратиграфического репера долгое время недооценивалось геологами. Накопление систематических данных о палеопочвах, использование методов датирования палеопочв и понимание роли для

палеогеографических реконструкций привело к становлению педостратиграфического метода. Установлено, что палеопочвы, связанные с перерывами в осадконакоплении и стабилизацией поверхности, позволяют различать отложения различного возраста. Степень выраженности палеопочв позволяет оценить временной интервал между циклами осадконакопления (Добровольский, Макеев, 2009).

Кроме того, палеопочвы, будучи климатически обусловленными объектами, позволяют коррелировать горизонты на больших пространствах, включая межконтинентальные (глобальные) стратиграфические корреляции (Добровольский, Макеев, 2009; Bronger, 2003). Во второй половине XX столетия педостратиграфический метод прочно вошел в арсенал стратиграфии.

Одной из проблем палеопочвоведения является потеря погребенными профилями дифференциации на горизонты, в результате чего многие погребенные почвы представлены только профилями, полностью состоящими из горизонта В, где отделить гумусовый горизонт А возможно только по следовым отличиям. Это связано с тем, что горизонты А палеопочв почти полностью теряют свое первоначальное органическое вещество (Kieft et al., 1998).

Палеопочвы аккумулируют в себе запись о многочисленных параметрах природной среды благодаря почвенной памяти. В настоящее время учение о почвенной памяти хорошо разработано (Таргульян, Горячкин, 2008). Под почвенной памятью понимается способность записывать и сохранять признаки, в том числе и в изменившихся природных условиях. Почвенные записи хорошо коррелируют с другими палеогеографическими архивами и совместно с палеонтологическими записями вносят важный вклад в разработку сценариев глобальных изменений климата. Интерес к палеопочвоведению возрос благодаря участию палеопочвоведов в реализации в рамках Международной программы Геосфера-Биосфера (IGBP), проекта по глобальным изменениям климата (PAGES — Past Global Change). Комиссия по палеопочвоведению входит в международные союзы: Международный Четвертичный Союз (INQUA),

Международный Союз Геологических Наук (IUGS). В Международный Союз наук о почве (IUSS) комиссия входила в качестве рабочей группы. В 2004 году Международный союз наук о почве преобразовал рабочую группу в Комиссию по палеопочвоведению. Это несомненное свидетельство возрастающего в мировой науке интереса к древним почвам как свидетелям истории и эволюции природы (Добровольский, Макеев, 2009).

Есть еще одна область знания, в которой палеонтология и палеопочвоведение тесно соприкасаются. Речь идет о геоархеологии и археологическом почвоведении. Обширные материалы по характеристике природно-климатических изменений в разные эпохи плейстоцена, и особенно голоцена получены при изучении погребенных почв под степными курганами и другими антропогенными захоронениями, а также в лессово-почвенных толщах и других объектах (Демкин, 1997; Добровольский, Макеев, 2009). Эти материалы позволяют не только проводить палеоландшафтные реконструкции, но и изучать историю становления человеческих цивилизаций. Интересы палеонтологии и археологии также тесно переплетаются.

Концепция памяти почв в понятийно не сформулированном виде активно использовалась и используется в палеопочвоведении и палеогеографии, где палеопочвы и древние коры выветривания, начиная с работ К. Д. Глинки (Добровольский, Макеев, 2009), трактовались как отражения, «отпечатки» былых природных и природно-антропогенных обстановок и процессов. Сущность почвенной памяти заключается в том, что в твердой фазе почвенной многофазной системы записываются инситные взаимодействия так называемых «поточковых» факторов (климат и биота) с «неподвижными» факторами (материнские породы и рельеф) на протяжении достаточно длинных отрезков времени. Поэтому, большинство исследований палеопочв, как правило, основано на изучении абиотических носителей почвопамяти (Таргульян, Горячкин, 2008). Однако носителями памяти почв могут быть биогенные объекты, в частности, свойства почвенной микобиоты могут быть описаны, как одна из форм биотической памяти

почв. У грибов, несомненно, выражена «функция памяти», так как они обладают структурами, которые могут достаточно долго сохраняться в среде обитания. Важно отметить, что для палеопочв как особых почвенно-геологических тел характерно наличие в грибных комплексах ряда видов, не обнаруживаемых в толще вмещающих слоев (Марфенина и др., 2009). Характер микобиоты, а именно, разнообразие и видовой состав грибных сообществ, присутствие и соотношение доминирующих и редких видов, структура грибной биомассы отражает определенную экологическую ситуацию в наземных экосистемах. В наибольшей степени примеры биотической (микробной) памяти почв следует искать в палеопочвах, которые подверглись быстрому перекрыванию, например аллювиальными или эоловыми наносами, оползнями и т. д., а также почвы, на которых в древности были насыпаны валы, курганы. О. Е. Марфениной было показано, что сообщества грибов в погребенных подкурганных почвах представлены в основном споровой массой, а не мицелием, и активных процессов деструкции в наше время не происходит (Марфенина и др., 2009). Чем глубже залегает погребенная почва, тем беднее видовое разнообразие почвенных микроскопических грибов. Также, существенным подтверждением почвенной «микологической памяти» могут быть сведения о свойствах микобиоты почв, испытавших сильное антропогенное воздействие в прошлом. Например, изучение микобиоты раннесредневековых поселений показало наличие ряда микологических свойств культурных слоев, во многом сходных со свойствами грибных сообществ современных городских почв. В культурных слоях антропогенно преобразованных почв может прослеживаться присутствие эколого-трофических группировок грибов, развивающихся на субстратах, которые могли накапливаться в результате деятельности человека в прошлом. Однако микологические свойства древних педореликтов нельзя рассматривать как строго консервативные, скорее микобиота включает как консервативные элементы, так и отчасти измененные в процессе сукцессий грибные сообщества (Таргульян, Горячкин, 2008).

1.2. Жизнь в подповерхностных местообитаниях

1.2.1. Изучение глубокопогребенных грунтов и многолетнемерзлых отложений

Современные знания о структуре биосферы позволяют утверждать, что жизнь не ограничивается тонкой пленкой на поверхности планеты, а продвинулась далеко вглубь земной коры (Brockman et al., 1992; Kieft et al., 1995; Kieft et al., 1998; Kieft et al., 1997). Появление микробной жизни в подповерхностных местообитаниях может быть объяснено двумя процессами: собственно, погребением на определенном этапе геологического времени и транспортом (вертикальным или латеральным) после погребения геологического пласта (Kieft et al., 1998). В гумидных зонах с большими объемами переноса грунтовых вод может доминировать транспорт с поверхности (как было показано для равнин Атлантики с залегающими под ними водоносными горизонтами) (Kieft et al., 1998; Murphy et al., 1992). Для подповерхностных экосистем с небольшими объемами переноса грунтовых вод, таких как богатые глинистыми частицами водоупоры, или для экосистем, расположенных в аридных и семиаридных регионах с достаточно низкими коэффициентами увлажнения, физическая фильтрация подавляет транспорт поверхностных организмов (Balkwill et al., 1998). В данных относительно статичных подповерхностных экосистемах микробные сообщества наиболее полно сохраняют черты древнего микробного сообщества. Микробиологические и геологические исследования подтверждают, что современные погребенные микробные сообщества в значительной степени сохраняют черты сообществ, существовавших на момент погребения (Дмитриев и др., 1997; Gilichinsky et al., 2007; Ivanushkina, Kochkina, Ozerskaya, 2005; Vishnivetskaya et al., 2001). Например, это подтверждено исследованиями сланцевых отложений времен Мела в бассейне Сан-Хуан в Нью-Мексико, где по меньшей мере часть сообщества сохранена со времен отложения морских осадков на этой территории (Fredrickson et al., 1997; Kieft et al., 1998). Также, микробы в глинистых древнеозерных отложениях Ринголд в Колумбийском бассейне на

востоке штата Вашингтон предположительно сохранились со времен Миоцена. (Fredrickson et al., 1995). Изменения, которым подвергается микробное сообщество со времени своего геологического погребения, могут быть рассмотрены как экологическая сукцессия. Находясь в достаточно статичных условиях, где исключен приток посторонних бактерий, сукцессия проявляется через естественный отбор популяций, приспособленных к длительному выживанию и размножению в условиях голодания.

Бактериальная биомасса, определяемая методом прямой микроскопии в глубокопогребенных почвоподобных грунтах составляет 10^4 - 10^5 клеток/грамм грунта. Базальное дыхание не детектируется вообще или составляет менее 0,03 мкг C-CO₂/г сухого веса грунта (Kieft et al., 1995). Численность и активная биомасса в погребенных образцах сильно зависит от глубины погребения образца, влажности и органического вещества, присутствовавшего на поверхности во время погребения территории. Внесение органического субстрата в целом не влияет на количество выделяемых жизнеспособных колоний, что свидетельствует либо о низкой способности к реактивации микробных сообществ глубокопогребенных местообитаний, либо о неверном подборе субстрата (Brockman et al., 1992). Исследователи отмечают крайне высокую гетерогенность микробного распределения в образцах глубокопогребенных грунтов, что сильно ограничивает и осложняет их микробиологический анализ (Stevens, Holbert, 1995).

Появление бактериальной палеонтологии в последние годы ознаменовались бурным развитием исследований микроорганизмов в зонах многолетней мерзлоты Арктики и Антарктики. Очень интересны исследования палеопочв в едомных отложениях — в ледово-лессовых комплексах в пределах современной криолитозоны (Губин, Занина, Максимович, 2003; Добровольский, Макеев, 2009; Gilichinsky, 2002). В погребенных криосинлитогенных почвенных горизонтах в замороженном виде представлены способные к воспроизводству микроорганизмы, и таким образом, мерзлые палеопочвы и грунты способны не только дать информацию о былой ландшафтной обстановке, но, и представляют

собой «музей замороженной жизни». Установлено, что в некоторых из этих более поздних (десятки, сотни лет тому назад) отложений, на значительной глубине (десятки и сотни метров) присутствуют микроскопические грибы (Кочкина, Иванушкина, Озерская, 2011; Марфенина и др., 2009). Изучение механизмов адаптации микроорганизмов к длительному захоронению, а в случае нахождения в зоне многолетней мерзлоты, еще и к низким температурам, позволит ответить на многие прикладные вопросы, такие как хранение коллекций без мутационных изменений (Кочкина, Иванушкина, Озерская, 2011). Исследования многолетнемерзлых грунтов Арктики и Антарктиды, погребенных под толщей льда, позволяют судить об особенностях микробиома, существовавшего миллионы лет назад (Gilichinsky et al., 2007), а также могут служить модельными системами для целей астробиологии. Особое значение изучение мерзлых толщ в криолитозоне приобретает в связи с оценками глобальных изменений климата (Добровольский, Макеев, 2009; Ривкина и др., 2002; Walter et al., 2006). Таяние мерзлых толщ и возобновление активности микроорганизмов может вызвать выделения метана, обладающего тепляющим эффектом на порядок выше, чем у двуокиси углерода. Суммарный эффект выделения метана может вызывать высвобождение углерода в количестве на два порядка превышающем промышленные выбросы в атмосферу.

Одной из самых больших проблем в работе с микробными сообществами многолетнемерзлых грунтов остается высокое содержание некультивируемых форм в составе сообщества. Выделение жизнеспособных культур также осложняется высоким содержанием анаэробных микроорганизмов. Общее число микроорганизмов в вечной мерзлоте варьирует в пределах 10^7 - 10^8 клеток/г (Rivkina et al., 2004), количество жизнеспособных микроорганизмов находится в диапазоне 10^2 - 10^3 кл/г (Vishnivetskaya et al., 2000). Показано, что в равных условиях роста штаммы микроорганизмов, выделенные из многолетнемерзлых грунтов демонстрируют более высокий адаптационный потенциал (более высокую стрессоустойчивость и внутривидовую вариабельность) по

сравнению с коллекционными аналогами (Кряжевских и др., 2013). В образцах многолетнемерзлых грунтов метаболическая активность регистрируется при температуре инкубирования до -20°C (Rivkina et al., 2000). В соответствии с классификацией Мориты (Morita, 1975), микроорганизмы вечной мерзлоты в основном являются психрофилами и психротолерантами. Установлено, что 95% от изолированных аэробных и анаэробных клеток не растут при температуре выше 30°C , но часто растут при температурах ниже 0°C (Gilichinsky, Wagener, Vishnevetskaya, 1995). Это в основном психротолерантные сообщества, которые были описаны как "сообщества выживших" (Abyzov, 1993), способных развиваться при малой доступности питательных веществ, что соответствует их нормальному физиологическому состоянию. Уникальность длительной консервации микроорганизмов в погребенных многолетнемерзлых местообитаниях обеспечена: 1) отсутствием поступления источников питания и энергии; 2) отсутствием доступной влаги (условия ангидробиоза); 3) постоянным воздействием отрицательных температур (условия криобиоза) в вечномерзлых отложениях (Кряжевских и др., 2013).

1.2.2. Изучение погребенных почв археологических памятников различного возраста

Более поздние этапы жизни биосферы могут быть охарактеризованы путем изучения погребенных почв археологических памятников и захоронений. Характеристика микробного сообщества почвы относится к числу важнейших диагностических показателей, отражающих условия почвообразования.

Известно, что микроорганизмы являются неотъемлемой составной частью почвы и участвуют практически во всех процессах, протекающих в ней. Поэтому характеристика микробного сообщества является диагностическим показателем условий почвообразования. В частности, палеопочвы археологических памятников, в зависимости от степени консервации, сохраняют ряд свойств с момента погребения (Демкин, 1997; Демкина и др., 2007), а, следовательно, это должно быть отражено в соответствующих параметрах их микробного сообщества

(Демкина и др., 2007). К настоящему времени нами проведены палеопочвенно-микробиологические исследования более 100 археологических памятников (курганов) эпох энеолита (IV тыс. до н.э.), бронзы (III-II тыс. до н.э.), раннего железа (V в. до н.э. – IV в. н.э.) и средневековья (XIII-XIV вв. н.э.) в различных природных районах Нижнего Поволжья (Среднерусская, Приволжская и Ергенинская возвышенности, Прикаспийская низменность) (Демкина и др., 2015). Микробиологические исследования палеопочв сухих и пустынных степей Нижнего Поволжья показали, что в них до настоящего времени сохраняются микробные сообщества, существовавшие во время сооружения археологических памятников. Это подтверждено выявленными закономерностями распределения численности микроорганизмов различных трофических групп в курганных насыпях, погребенных и современных почвах, данными определения микробной фракции с использованием метода ^{14}C атомной масс-спектрометрии. Суммарная биомасса микробных сообществ подкурганных палеопочв, включающая клетки на разных стадиях их жизненного цикла, в том числе нежизнеспособные, составляет 20-40% от микробной биомассы современных аналогов, то же соотношение наблюдается для микроскопических грибов – биомасса грибного мицелия в палеопочвах составляет 20-30% от биомассы грибного мицелия в современных аналогах (Демкина, Попова, Демкин, 2013). В погребенных почвах присутствует определенный пул жизнеспособных микроорганизмов, оцененный по содержанию фосфолипидов, который сопоставим с таковым в фоновой почве (24-46% от уровня современного). Содержание мицелия снижается до 43-50%, причем возрастает доля темноокрашенного. Полученные доказательства консервации в подкурганных палеопочвах микробных сообществ прошлых исторических эпох дают основания использовать различные микробиологические параметры в качестве индикаторов динамики палеоклимата. Т. С. Демкиной с соавторами установлены микробиологические параметры, дающие контрастную характеристику состояния палеопочвенных микробных сообществ в аридные и гумидные климатические периоды. К их числу относятся: активная биомасса

микроорганизмов; ее доля от суммарной микробной биомассы и Сорг. почвы; эколого-трофическая структура микробного сообщества, характеризующаяся соотношением микроорганизмов, растущих на почвенном агаре и использующих элементы питания из рассеянного состояния, на нитритном агаре и потребляющие гумус, на богатой органической среде и разлагающие органические остатки; соотношение численности микроорганизмов, использующих легкодоступное органическое вещество – растительные остатки и труднодоступное – гумус; индекс олиготрофности. Смена климатических эпох фиксировалась в структуре микробных сообществ палеопочв на эколого-трофическом, метаболическом и генетическом уровнях (Демкина и др., 2010).

Показано, что вклад фактора времени на дисперсию численности микроорганизмов различных трофических групп является достоверным (Демкина и др., 2016).

Изучая индикаторные свойства сообществ (структуру и биомассу) погребенных почв, ученые вынуждены сталкиваться с рядом проблем. Например, оценку биомассы и структуры микробоценоза почвы часто проводят методом субстратиндуцированного дыхания (СИД) с определением соотношения различных трофических групп внутри сообщества (Демкина, Борисов, Демкин, 2004; Каширская и др., 2009). Однако, показано, что биомасса микроорганизмов, определенная методом СИД, в палеопочвах составляет от 0,03 до 11,7% от их суммарной биомассы (Демкина и др., 2016; Каширская и др., 2009). В связи с этим Т. Э. Хомутовой (2004) и Н. Н. Каширской (2009) с соавторами был предложен альтернативный подход, позволяющий определить суммарную микробную биомассу, включающую бактериальные клетки на разных стадиях жизненного цикла. Суть подхода заключается в расчете суммарной биомассы на основе прямого определения углерода экстрагированной микробной фракции и пересчетного коэффициента – полноты экстракции клеток (Каширская и др., 2009; Хомутова, Демкина, Демкин, 2004).

Большое значение в исследованиях, посвященных погребенным

местообитаниям, имеет определение активной биомассы и соотношения активной и суммарной биомасс. Численность микроорганизмов различных трофических групп, соотношение суммарной и активной микробной биомассы свидетельствует об изменении палеоэкологических условий, существовавших в ту или иную историческую эпоху (Каширская и др., 2010). Например, Т. Э. Хомутовой (2004) с соавторами было показано, что доля биомассы активно метаболизирующих клеток в погребенных почвах снижается по сравнению с суммарной биомассой на 1-3 порядка по сравнению с современной почвой. Однако в ряду исследованных палеопочв можно наблюдать определенную закономерность в динамике доли активной биомассы, что авторы связывают с динамикой палеоклиматических условий (Демкина и др., 2015; Хомутова, Демкина, Демкин, 2004). Для определения живой биомассы микробных сообществ также применяют метод оценки соотношения содержания фосфолипидов и углерода в микробных клетках. Фосфолипиды являются необходимыми компонентами всех живых клеток, входят в состав клеточных мембран бактерий, актиномицетов, грибов, низших растений и пр. После гибели клеток они быстро разрушаются и не встречаются в клеточных продуктах запасаения. Этот подход позволяет оценить величину живой микробной биомассы в различных природных экосистемах. Содержание микробных фосфолипидов можно соотнести не только с численностью клеток, но и с содержанием в них органического углерода (Хомутова, Каширская, Демкин, 2011). С помощью данного метода было показано, в верхних горизонтах современной почвы доля живой микробной биомассы в суммарной биомассе существенно меньше по сравнению с подкурганными почвами и составляет до 50% от значений в современных почвах (Демкина и др., 2016). Доля микробной биомассы в общем органическом углероде максимальна в палеопочвах эпохи бронзы (4000-5000 л.н.) и достигает 40%, что объясняется повышенной увлажненностью климата (Хомутова, Каширская, Демкин, 2011).

Метаболическая активность микробных сообществ органических горизонтов погребенных почв существенно снижена по сравнению с современными

аналогами, однако, их устойчивость, определенная методом СИД (коэффициент дыхательной активности) практически не уступает современным аналогам (Демкина и др., 2016). Показано, что внесение глюкозы не оказывает влияние на показатель субстратиндуцированного дыхания из погребенных палеопочв, что свидетельствует о необходимости подбора условий реактивации таких сообществ (Каширская и др., 2016). Для образцов погребенных почв показано, что их ферментативная активность по абсолютным значениям либо ниже (фосфатазная и уреазная активность) либо схожа (пероксидазная активность) с современными аналогами (Каширская и др., 2013; Хомутова и др., 2012). Однако, исследования показали, что амилазная активность погребенных почв и многолетнемерзлых грунтов превышает амилазную активность современных аналогов при добавлении стимулирующих концентраций низкомолекулярных алкилрезорцинолов и аминокислот, причем повышение ферментативной зависимости происходит дозозависимо. Даже незначительные добавки низкомолекулярных веществ провоцировали значимый ответ микробного сообщества на внесение крахмала в почву, что подтверждает пока слабо исследованный биотехнологический потенциал погребенных местообитаний (Demkina et al., 2015).

Большое внимание уделяется особенностям морфологии клеток почвенных микроорганизмов погребенных почв, поскольку для оценки биомассы в единицах микробного углерода необходимо учитывать так же структуру клеток. Этот вывод связан со способностью организмов образовывать на поверхности клеток плотный и толстый органо-минеральный слой (Каширская и др., 2010), наличие и толщину которого можно определить преимущественно методами электронной микроскопии. В работах, посвященных данному вопросу, можно увидеть выводы о том, что в палеопочвах клетки с органо-минеральным слоем составляют практически всю микробную биомассу. При этом микробная биомасса в палеопочвах составляет значительную часть от общего органического углерода почв. Таким образом, большая часть остаточного органического углерода, не подвергнувшегося диагенетическим преобразованиям, в палеопочвах сохраняется

именно в микробном сообществе, находящемся в состоянии покоя (Каширская и др., 2010). Т. С. Демкина с соавторами при помощи метода электронной микроскопии показали, что 77% клеток в горизонте А1 погребенной каштановой почвы относятся к наноформам (объемы не превышают $0,09 \text{ мкм}^3$), что превышает содержание наноформ в современных аналогах (63%) (Демкина и др., 2010).

Несколько особняком стоят исследования, основанные на оценке пулов микробной ДНК в палеопочвах. Проблема заключается в выборе микробиологических характеристик, позволяющих сравнивать биомассу, активность и количество экстрагируемой ДНК микробных сообществ почв, погребенных несколько тысячелетий назад. Долгое время оставалась неизученной связь между количеством ДНК, экстрагируемым из образцов палеопочв, с одной стороны, и биомассой и активностью, с другой. Е. В. Благодатской с соавторами (2003) была проведена работа по изучению зависимости между количеством ДНК, экстрагируемым из погребенных почв и кинетическими показателями дыхательной активности почвенных микроорганизмов. В работе было показано, что при длительной консервации при неблагоприятных условиях многие покоящиеся формы микроорганизмов теряют жизнеспособность, сохраняя морфологическую целостность клеток, и образуют микромумии (Благодатская и др., 2003), существование таких мумифицированных форм микроорганизмов может приводить к определению большого количества ДНК при сравнительно низкой биомассе сохранивших жизнеспособность организмов. Были сделаны выводы о том, что количество экстрагируемой ДНК тесно коррелирует с общей микробной биомассой и позволяет судить о величине пулов генетического материала микроорганизмов, «законсервированных» в палеопочвах. Однако, содержание ДНК не отражает способности к физиологической и метаболической активности микроорганизмов, сохранившихся в этих почвах (Благодатская и др., 2003).

Проводятся работы по изучению влияния длительного погребения на свойства штаммов. Например, в статье Фомичевой и др. (2006) исследуются

штаммы вида *Aspergillus versicolor*, выделенные из почв различного возраста погребения (современных почв, погребенного культурного слоя III века до н. э., приморского торфа, мерзлотных грунтов, возраст которых 100 тыс. лет). Существенных морфологических и эколого-трофических различий между разновозрастными штаммами выявлено не было, штамм из древних мерзлотных грунтов имел наибольшие отличия от остальных по генетическим признакам (Фомичева, Василенко, Марфенина, 2006).

Изучение штаммов, перенесших длительное погребение, ведется также для уточнения таксономии видов. Так, в настоящее время предложена новая полифазная таксономия пенициллов подрода *Penicillium*, в который, наряду с микро- и макроморфологическими признаками используется состав вторичных метаболитов. Спектр метаболитов, продуцируемых грибами-реликтами, может помочь более точно определять видовую принадлежность изолятов, выделенных из многолетнемерзлых отложений (Желифонова и др., 2009).

1.3. Биотехнологический потенциал погребенных микробных сообществ

Микроорганизмы, выделенные из погребенных почв часто имеют уникальные характеристики метаболизма, которые могут быть использованы в биотехнологии. В настоящее время поиск новых продуцентов биологически активных соединений активно ведется среди грибов, находящихся в экстремальных условиях, так как именно у них с большей вероятностью можно ожидать синтез новых вторичных метаболитов и потенциальных биологически активных соединений, которые помогают продуценту выживать и адаптироваться к данным условиям (Козловский, Желифонова, Антипова, 2005). А. Г. Козловским с соавторами (2003) было показано, что выделенные из древних отложений Арктики и Антарктики реликтовые штаммы *Penicillium aurantiogriseum* являются более эффективными продуцентами дикетопиперазиновых алкалоидов рокефортин и 3,12-дигидророкефортин, чем ранее известные продуценты, выделенные из современных мест обитания. Также, одним из результатов при исследовании данных штаммов явилось подтверждение гипотезы об одном из

значений алкалоидов как аккумуляторов избытка в клетках азота (Козловский и др., 2003). Из культуральной жидкости гриба *Penicillium citrinum*, выделенного из древних вечномерзлотных отложений Арктики, были выделены ранее неизвестные хинолиновые алкалоиды хиноцитринины – хиноцитринин А и хиноцитринин Б, обладающие биологической активности, в том числе антибиотическими свойствами (Козловский, Желифонова, Антипова, 2005). На примере реликтовых штаммов *P. citrinum* изучен альтернативный тип биосинтеза вторичных метаболитов (биосинтез начинается одновременно и идет параллельно роста культуры), который отличается от основного типа (проходит в 2 фазы: трофо-фаза – фаза роста, идео-фаза – фаза активного синтеза метаболитов) (Козловский, Желифонова, Антипова, 2005). Штамм гриба *Penicillium palitans*, выделенный из многолетнемерзлых древних отложений, является активным продуцентом клавиновых эргоалкалоидов – фумигаклавина А, фумигаклавина Б и фетуклавина. Фетуклавин наряду с обычными для эргоалкалоидов видами биологической активности обладает цитостатическим эффектом и антибиотическими свойствами.

Многолетнемерзлые грунты могут стать источниками продуцентов холодоустойчивых ферментов (Новотоцкая-Власова и др., 2013; Петровская и др., 2012). Показано, что штаммы микроорганизмов, выделенные из многолетнемерзлых отложений обладают большей термоустойчивостью, чем их коллекционные аналоги (Демкина, Соина, Эль-Регистан, 2000).

ГЛАВА 2. ПРОБЛЕМА ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ И ТРУДНОРЕАКТИВИРУЕМЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Интерес к изучению погребенных местообитаний существенно возрос в связи с растущим интересом к явлению торможения жизненной активности микроорганизмов. Это связано, во-первых, с развитием учения о биохимической адаптации микроорганизмов; во-вторых, с интересом к гипотезе первичного заселения земли из космоса и, в-третьих, с такой «вечной» биологической

проблемой как переход от жизни к смерти и понимание последней как биологического феномена. Латентная жизнь стала предметом многих исследований после открытия апоптоза и необычных «переживающих» форм, найденных в последние годы среди микроорганизмов и растений. Например, образование главным образом у грамотрицательных бактерий жизнеспособных, но не культивируемых клеток с очень низким уровнем метаболизма (Феофилова, 2003). Феномен торможения жизненной активности имеет прикладное значение в связи с освоением северных территорий с огромными пространствами вечной мерзлоты и грядущим освоением космических пространств. Особое значение этот феномен приобретает в современной биотехнологии, в частности при хранении и приготовлении активного посевного спорового материала. Обработка спор микроорганизмов низкими температурами увеличивает выход конечного продукта, в частности антибиотиков, улучшает качество винной продукции, повышает урожайность с/х культур и содержание в них сахаров (Феофилова, 2003).

2.1. Механизмы образования покоящихся форм прокариот

Описание в 1876 г. Ф. Коном и Р. Кохом эндоспор бацилл положило начало исследованиям покоящихся форм микроорганизмов в природной среде и в организме человека. Формируемые в циклах развития культур всех бактерий так называемых «микроцист», являющихся инструментом выживания вида при различных условиях окружающей среды впервые было постулировано Биссетом (Мулюкин, 2010). Дальнейшее разделение адаптивных стратегий микроорганизмов на спорообразование и все остальные стратегии положило начало классификации покоящихся форм. Споры являются хорошо изученной адаптивной стратегией, свойственной так называемым спорообразующим бактериям (Yergeau et al., 2012), в то время как спектр адаптаций у неспорообразующих бактерий достаточно широк и не столь хорошо изучен. Трактовка термина «покой» для неспорообразующих бактерий широка и охватывает: (1) клетки культур стационарной фазы (Vulic, Kolter, 2001); (2)

некультивируемые формы (Kaprelyants, Gottschal, Kell, 1993; Roszak, Colwell, 1987); (3) неактивные клетки в биопленках (Costerton, 1999); (4) антибиотико-устойчивые персисторы (Shah et al., 2006); (5) клетки цистоподобного типа (Мулюкин, 2010). Поскольку процесс образования бактериальных спор является хорошо изученным и неоднократно освещался в литературе, а изучение биопленок и антибиотико-устойчивых персисторов никак не касаются экспериментальной части диссертационной работы, остановимся подробнее на механизмах перехода клеток неспорообразующих прокариот в некультивируемое состояние и образование ЦПК.

Одними из основных механизмов перехода в покоящееся состояние у неспорообразующих бактерий являются в первую очередь способность образовывать цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК) (Эль-Регистан, 2005; Эль-Регистан и др., 2006) или приобретать некультивируемое состояние (Kaprelyants et al., 1996). Однако, если способность образовывать споры является строго штаммо- и видо- специфичной чертой, то способность образовывать ЦПК, предназначенные для длительного выживания и сохранения вида, оказалась свойственна не только неспорообразующим, но и спорообразующим бактериям и реализуется в условиях, когда спорообразование репрессировано, например, в условиях катаболитной репрессии (Эль-Регистан и др., 2006). Возможность образования ЦПК была продемонстрирована для бактерий родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Methylococcus*, *Thioalkalivibrio*, *Thioalkalimicrobium*, архей рода *Natrinema*, дрожжей родов *Saccharomyces* и *Rhodospiridium*. ЦПК обладают всеми признаками покоящихся форм микроорганизмов, согласно принятым в спорологии критериям: 1) длительным сохранением жизнеспособности, предназначенностью для репродукции (по показателям КОЕ); 2) резко сниженным и экспериментально невыявляемым уровнем метаболизма, что является признаком анабиотического состояния; 3) повышенной устойчивостью к неблагоприятным и повреждающим воздействиям; 4) отличительными особенностями ультраструктурной

организации; 5) образованием в цикле развития микробной культуры как необходимой стадии в ее онтогенезе (Эль-Регистан и др., 2006).

Основным агентом обеспечивающим переход клеток микроорганизмов в анабиотическое состояние является аутоиндуктор, обозначаемый как фактор d1 (Эль-Регистан и др., 1979). По своей природе он относится к алкилоксибензолам (АОБ) (Мулюкин и др., 2001) и накапливается в культуре во время ее роста. В зависимости от величины pH АОБ растворяются либо в мембранных липидах ($pH < 7$), что позволяет им накапливаться в клетках, вызывая переход в анабиотическое состояние, либо в водной фазе ($pH = 7,0$), что позволяет им выходить в окружающую среду, приводя к ослаблению блокировки метаболизма и в итоге – к прорастанию ПК. Также, важным является аутоиндуктор автолиза d2, выделяемый культурой на всех стадиях роста и осуществляющий опосредованное влияние на формирование ЦПК (Светличный и др., 1982). По химической природе он является смесью ненасыщенных жирных кислот (Светличный и др., 1983), вызывающей лизис большей части популяции с одновременным высвобождением из клеток питательных веществ и дополнительных количеств фактора d1. Фактор d1 не обладает видоспецифичностью, но микроорганизмы различаются как по продуктивности, так и по чувствительности к их воздействию (Мулюкин и др., 2006). Таким образом, фактор d1 выступает в качестве регулятора на уровне сообществ (Мулюкин и др., 2001). Примечательно, что продуктивность по АОБ у клеток, выделяемых из природных источников, существенно выше, чем у коллекционных штаммов, что, вероятно, обуславливает их высокую выживаемость в таких местообитаниях как вечномёрзлые почвы и отложения (Мулюкин и др., 2001).

ЦПК образуются грамположительными и грамотрицательными бактериями, а также археями и эукариотическими организмами (дрожжами) на постстационарной стадии развития культур при таких модификациях условий роста, которые стимулируют биосинтез фактора d1. Такими условиями роста являются:

1) Различные виды стресса

- **Дефицит питательных элементов.** Дефицит азота (Дорошенко и др., 2001; Suzina et al., 2006), стимулирующий липогенез, а также кислорода и фосфора, приводящий к повышению уровня восстановителей в клетке приводит к образованию количества ЦПК, которое может составлять 1090% от начального числа КОЕ (Дорошенко и др., 2001; Lothigius et al., 2010; Rezaeinejad, Ivanov, 2011)

- **Температурный стресс** (González, Hänninen, 2012; Trevors et al., 2012)

- **Окислительный стресс** (Atack, Kelly, 2009; Reuter et al., 2010)

- **Солевой стресс** (Pinto et al., 2011)

- **Облучение УФ** (Chen et al., 2012; Hamblin et al., 2005)

- **Осмотический стресс** (Asakura et al., 2008; Chong, Wong, Fane, 2008)

- **Органические поллютанты и тяжелые металлы** (Divol, Toit du, Duckitt, 2012; Luna et al., 2012; Zhang, Mörtelmaier, Margesin, 2012)

2) **Ассоциации с другими микроорганизмами.** В этом случае покоящиеся клетки образуются либо для переживания неблагоприятных условий (например, совместно с простейшими) (Пушкарева, 2004), либо в ответ на воздействие токсичных экзометаболитов (Солохина, Пушкарева, Литвин, 2001).

3) **Автолизирование клеток.** Фактор d1 также содержится в высокой концентрации в автолизирующихся суспензиях, типичных для стареющих микробных культур. Он высвобождается из лизирующихся микробных клеток. Это дает возможность остальным клеткам перейти в покоящееся состояние, причем количество образуемых культурой ЦПК прямо зависит от скорости автолиза (Демкина, Соина, Эль-Регистан, 2000).

4) **Экзогенное внесение аутоиндуктора анабиоза,** что обуславливается вымораживанием или пересыханием, например, почвы, или латеральным или горизонтальным притоком.

5) Спорообразующие микроорганизмы могут формировать ЦПК в случаях,

когда образование спор невозможно, например, при **повышении концентрации глюкозы *in vitro*** (Дорошенко и др., 2001; Soina et al., 2004) в вечномерзлых почвах (Дмитриев и др., 2004).

При формировании ЦПК клетка претерпевает структурные (обезвоживание протопласта, утолщение клеточной стенки, агрегация рибосом, образование полисахаридного чехла, конденсация нуклеоида) и химические изменения. В ЦПК изменено содержание основных элементов: калия (вторичный клеточный эффектор), кальция (участвует в создании трансмембранного потенциала), фосфора (входит в состав нуклеотидов), и серы (компонент белка), что свидетельствует о сдвиге ионного гомеостаза (Пахомов, Блинкова, Стоянова, 2010)

В работах El-Registan G.I. et al., (El-Registan et al., 2005), а так же Ильинской О.Н. и др. (Ильинская и др., 2002) показано, что АОБ играет важную роль в защите клеток микроорганизмов от различных стрессов. Показано, что алкилоксибензолы, которые накапливаются в клетках стационарной фазы и покоящихся клетках, обладают антиоксидантной активностью и участвуют в формировании неферментативной антиоксидантной защиты мембранных липидов и других клеточных структур (El-Registan et al., 2005). Это является особенно важным в условиях ингибирования метаболических активностей клетки. В ответ на стрессовые воздействия, такие как, например, тепловой шок, уровень их биосинтеза резко повышается (El-Registan et al., 2005). Фактор d1 модифицирует мембранные липиды, вследствие чего увеличивается микровязкость мембраны из-за образования водородных связей между ароматическим кольцом АОБ и молекулами фосфолипидов. Это приводит к увеличению проницаемости мембраны для одновалентных катионов, несущих гидратационные рубашки, и затем к обезвоживанию протопласта клетки. Дополнительное образование микропор в мембране приводит к выходу воды из клеток. Вследствие снижения жидкости мембран ингибируются их транспортные, энергопродуцирующие и другие функции, прекращаются синтетические процессы, а так же активность

связанных с мембраной интегрированных в нее ферментов (деполимераз и автолизин) (Пахомов, Блинкова, Стоянова, 2010). Обусловленное дегидратацией мембраны ингибирование клеточных ферментов усиливается еще и тем, что молекулы АОБ образуют комплексы с молекулами биополимеров за счет слабых физико-химических взаимодействий, изменяя их конформацию (Степаненко и др., 2005; El-Registan et al., 2005), как было показано Беспаловым М.М. с соавторами (Беспалов и др., 2000) в опытах по снятию спектров флуоресценции индивидуальных АОБ и РНКазы, а так же их смесей в различных пропорциях. Фактор d1 является универсальным и не обладает видоспецифичным действием (Мулюкин и др., 2001). Таким образом, механизм протекторного действия АОБ, по видимому, обусловлен их полифункциональностью как 1) ловушек активных форм кислорода 2) структурных стабилизаторов клеточных мембран 3) стабилизаторов ферментных белков, повышающих их устойчивость к денатурирующим воздействиям в образующихся комплексах «фермент-АОБ» (Степаненко и др., 2005). Также, различные АОБ проявляют протекторное действие в отношении ДНК, что показано в опытах по хранению полимерных молекул ДНК в водных растворах АОБ. Выявлено предупреждающее действие АОБ, оказывающее влияние на деградацию ДНК, а также сохраняющее действие, оказывающее влияние на ее вязкостные характеристики и электрофоретическую подвижность (Давыдова, Дерябин, Эль-Регистан, 2006). Производный АОБ обнаруживаются не только у микроорганизмов, но и в растениях, преимущественно в семенах, что позволяет аналогизировать функции АОБ в регуляции клеточного ответа и контроле покоящегося состояния у микроорганизмов и растений (Эль-Регистан и др., 2006).

Воздействие аномально высоких концентраций фактора d1 на жизнеспособность клетки вызывает необратимые изменения и при внешнем сохранении целостности и морфологии такие клетки, названные «микромумиями», не способны восстанавливать пролиферативную активность. При воздействии АОБ в концентрациях на уровне 10^{-3} М, происходит полное

разрушение цитоплазматической мембраны у большинства клеток. У клеток, сохранивших участки мембраны, наблюдаются крупные внутримембранные частицы. Цитоплазма становится мелко гранулированной, однородной. Подобные «микромумии» образуются так же в количестве около 3-4% в длительно хранящихся концентрированных суспензиях клеток (Сузина и др., 2001).

2.2. Роль покоящихся форм микроорганизмов в поддержании гомеостаза сообщества

Первые эксперименты, подтверждающие роль покоящихся форм в формировании так называемой «фенотипической диссоциации» были проведены еще Bigger в 1944 году (Bigger, 1944). Он провел эксперимент, в котором подвергал чистые культуры стафилококков воздействию концентраций пенициллина, обычно летальных для таких культур и обнаружил, что дозы действительно являлись летальными для абсолютного большинства клеток, но одна клетка на миллион выживала. Эти «выжившие» или «персисторы» не являлись генетическими мутантами, резистентными к пенициллину, поскольку при переносе в свежую среду и последующем делении они оказывались чувствительны к антибиотику в той же степени, что и изначальная культура. Единственным возможным объяснением могло послужить то, что клетки этих «персисторов» были покоящимися, чей покой заключался в неспособности к размножению на среде, которая, при прочих равных, должна была спровоцировать их рост и деление, если исключить пенициллин. Поскольку пенициллин действовал только на делящиеся клетки, «персисторы» оставались фенотипически резистентными к нему. Впоследствии, Luria and Latarjet (Luria, Latarjet, 1947) заметили, что примерно 1% клеток культуры *Escherichia coli* показали фенотипическую резистентность к стерилизующим дозам ультрафиолетового облучения.

Даже для «гомогенных» лабораторных монокультур показана сильная вариабельность объемов клеток (Davey, Kell, 1996; Ghaemmaghami et al., 2003) и уровня генной экспрессии (Raser, O'Shea, 2005). Любая лабораторная культура

изначально имеет в своем составе клетки «покоящиеся» по определению. Такая стратегия выживания микроорганизмов хорошо известна и описывается как стратегия «перестраховки», когда вариабельность свойств сообщества оказывается предпочтительнее средней скорости размножения всех его членов (Kell, Potgieter, Pretorius, 2015). Социальное поведение бактерий проявляется не только при их поверхностном росте (колонии), но также выражено в условиях глубинного культивирования. Клетки одноклеточных микроорганизмов синхронизируют свои ответы на сигналы, поступающие из окружающей среды, что создает так называемый «клеточный кворум». Ощущение клеточного кворума определяется пороговым уровнем внеклеточных ауторегуляторов, который зависит от плотности клеток в объеме, и используется как средство контроля за разнообразными процессами, включающими в себя ограничение численности популяции, цитодифференцировку клеток при образовании покоящихся форм, развитие генетической компетентности, сопряженное с передачей плазмид, формирование биопленки и биофильма, индукцию синтеза вторичных метаболитов, факторов вирулентности и др. (Эль-Регистан, 2005).

Показано, что переход клеток в покоящееся состояние и их последующее прорастание приводит к расширению диссоциативного спектра популяций, что проявляется в первую очередь в 1) разнообразии морфотипов колоний и 2) развитии на селективных средах антибиотикоустойчивых клонов (показано для культур *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii*) (Кряжевских и др., 2013; Лойко и др., 2015; Мулюкин и др., 2015; Мулюкин и др., 2014).

Гетерогенность особей в природных местообитаниях обусловлена в первую очередь многофакторностью воздействия окружающей среды на популяцию. Несмотря на то, что каждая клетка обладает полным спектром приспособлений для переживания стресса, гетерогенность популяции обеспечивает ее выживаемость в целом. При стрессе у какой-то части популяции будет шанс его

пережить и колонизировать «очищенную нишу» или новую среду обитания. Для культур, выделенных из природных местообитаний различной степени загрязненности показано, что показатель гетерогенности популяции прямо коррелировал со степенью загрязненности территории, а при конкурентном сравнении сообществ более гетерогенное сообщество показывало более высокие показатели выживаемости (Holland et al., 2014).

Процесс перехода микроорганизмов в покоящееся состояние оказывает влияние на процессы репликации и транскрипции, что обуславливает повышение гетерогенности популяции при возвращении клетки к жизнеспособному состоянию (Давыдова и др., 2005; Давыдова, Дерябин, Эль-Регистан, 2006; Ильинская и др., 2002). В экспериментах гетерогенность популяций, переведенных в покоящееся состояние при помощи искусственных аналогов фактора $d1$, напрямую зависела от его концентрации (Мулюкин и др., 2005; Хабибуллин и др., 2006). Введение в популяцию АОБ может индуцировать возникновение мутаций, таких как замены пар оснований или сдвиг рамки считывания гена (Ильинская и др., 2002). Обработка АОБ таких генетически стабильных образований как споры бацилл приводила к расщеплению основного варианта на несколько (Хабибуллин и др., 2006). При длительной экологической нагрузке происходит выщепление клонов, обладающих большей устойчивостью к факторам стресса, таких как голодание или переохлаждение (Мулюкин и др., 2001).

2.3. Вывод клеток прокариот из покоящегося состояния в естественных условиях и в условиях лаборатории

В случае изолированных природных местообитаний очевидно, что питательные вещества и источники энергии со временем имеют свойство истощаться и, по вполне понятным энергетическим причинам, деление клеток становится невозможным и большая часть сообщества переходит в покоящееся состояние. В таких случаях самым простым методом реверсии клеток к жизни является внесение питательных веществ (Allison, Brynildsen, Collins, 2011a;

Allison, Brynildsen, Collins, 2011b). Также применяется введение сидерофоров (Hider, Kong, 2010; Kell, 2009; Kell, 2010), пептидов клеточной стенки (Dworkin, Shah, 2010; Nikitushkin, Demina, Kaprel'iantz, 2011), и различных сигнальных молекул (Nichols et al., 2008; Stevenson et al., 2004). Показано, что реанимация клеток из покоящегося состояния с применением богатых сред не всегда дает положительный результат (Whitesides, Oliver, 1997).

Эффективным способом при реактивации покоящихся форм показало себя удаление окислительного стресса. Так, клетки *E.coli* (Mizunoe et al., 1999) и *Vibrio vulnificus* (Bogosian et al., 2000) реверсировали к культурабельному состоянию в присутствии каталазы и пирувата натрия.

Одним из факторов, позволяющих вывести клетки из покоящегося состояния, является фактор Rpf (Resuscitation Promoting Factor), выделяемый в среду культурой *Micrococcus luteus* (Mukamolova et al., 2006). Этот белок, добавленный либо в виде препарата, либо в виде супернатанта культуры, вызывает реверсию к жизни покоящихся клеток микроорганизмов, причем не только изначальной культуры, но и ряда других, как грамположительных (таких как *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium smegmatis*, и *Mycobacterium tuberculosis*), так и грамотрицательных (таких как *Curvibacter fontanus* (Ding, Yokota, 2010). Показано наличие гомологичных генов у ряда микроорганизмов, таких как *Mb. smegmatis*, *Corynebacterium glutamicum*, и *Streptomyces spp* и *Salmonella typhimurium* (Panutdaporn et al., 2006). Исследования гена rpf активно ведутся в связи с его фундаментальным значением, как реактиватора микробных сообществ, и прикладным значением (например, для терапии туберкулеза). Он обнаруживается у все большего числа микроорганизмов (Puspita et al., 2013). Инактивация гена rpf у *Micrococcus luteus* оказалась невозможной, что указывает на его фундаментальное значение для выживания клетки (Keep et al., 2006; Mukamolova et al., 2006). Белки семейства rpf обладают протеолитической активностью, что косвенно указывает на то, что реактивация покоящихся форм требует гидролиза клеточной стенки с выходом факторов,

способствующих пробуждению (Keer et al., 2006).

По-видимому, для наиболее эффективной реактивации клеток покоящихся форм из некультивируемого состояния необходимо применять комплекс мер, направленный на отмывку клеток от аутоингибиторов спорового прорастания и добавление внеклеточных активаторов микробной или растительной природы, поскольку коммуникативные взаимоотношения в почвенных сообществах происходят как между микроорганизмами, так и между иктроорганизмами и растениями и животными. В частности, показана роль растительных лектинов (агглютини́на зародышей пшеницы – АЗП) (Антонюк, 2005) и индолилуксусной кислоты (Mockaitis, Estelle, 2008) в бактериально-растительных взаимодействиях. Комплекс мер, направленный на реактивацию почвенного сообщества из образцов погребенных почв и подпочвенных многолетнемерзлых отложений разработан Кряжевских с соавт. и включает в себя 1) отмывку образцов после пробоподготовки в течение 1.5 ч, дистиллированной H₂O); б) инкубацию образцов в течение 1 ч с индолил-уксусной кислотой; 2) получение микробной фракции и ее дальнейшую прединкубацию в течение 1.5 ч с: а) дрожжевым экстрактом (0.01– 0.1%); б) агглютинином зародышей пшеницы (1.0; 2.5 мкг/мл); в) дрожжевым экстрактом (0.1%) и глюкозой (1%); г) С₇-АОБ (50 мкг/мл); д) пируватом Na (0.1%). Была показана эффективность данных приемов – число КОЕ возрастало на порядки (в некоторых случаях с 0 до 10³-10⁷ кл/г). Была выявлена разница в механизмах приобретения состояния клеточного покоя у покоящихся форм, конститутивно формирующихся в голодающих постстационарных бактериальных популяциях, и у анабиотических форм, образующихся под влиянием высоких концентраций аутоиндукторов анабиоза. Последний механизм образования покоящихся и некультивируемых клеток может быть реализован в криопегах мерзлоты в результате повышения в них концентрации аутоиндукторов анабиоза. Также, в статье впервые было показано влияние растительных метаболитов – индолил-уксусной кислоты и агглютини́на зародышей пшеницы на реактивацию почвенных сообществ, что расширяет

представления о влиянии факторов межклеточной коммуникации на поддержание биоразнообразия и выживание бактериальных сообществ *in situ* в почвенных субстратах различного генезиса (Кряжевских и др., 2012).

2.4. Биотехнологический потенциал покоящихся форм почвенных микроорганизмов

Реактивированные покоящиеся формы микроорганизмов часто обладают свойствами, отличными от их коллекционных аналогов, которые могут быть использованы в биотехнологии. Например, штаммы бактерий, выделенные из почв и переведенные в культивируемое состояние путем добавления супернатанта *Micrococcus luteus* были протестированы на предмет флокулирующей способности. Было показано, что комбинированная культура трех штаммов *Arthrobacter*, *Chryseobacterium* и *Rhodococcus*, находившихся до этого в покоящемся состоянии, обладает высокой флокулирующей способностью. Эффективность флокуляции достигала 98,23 % (Su et al., 2012). При испытании флокулянта при очистке сточных вод была показана его высокая эффективность – показатели мутности, цветности и химическая потребность в кислороде достигали 92,57, 94,73 и 92,12 % соответственно (Su et al., 2013). Схема возможного применения флокулянтов приведена на Рис. 1.

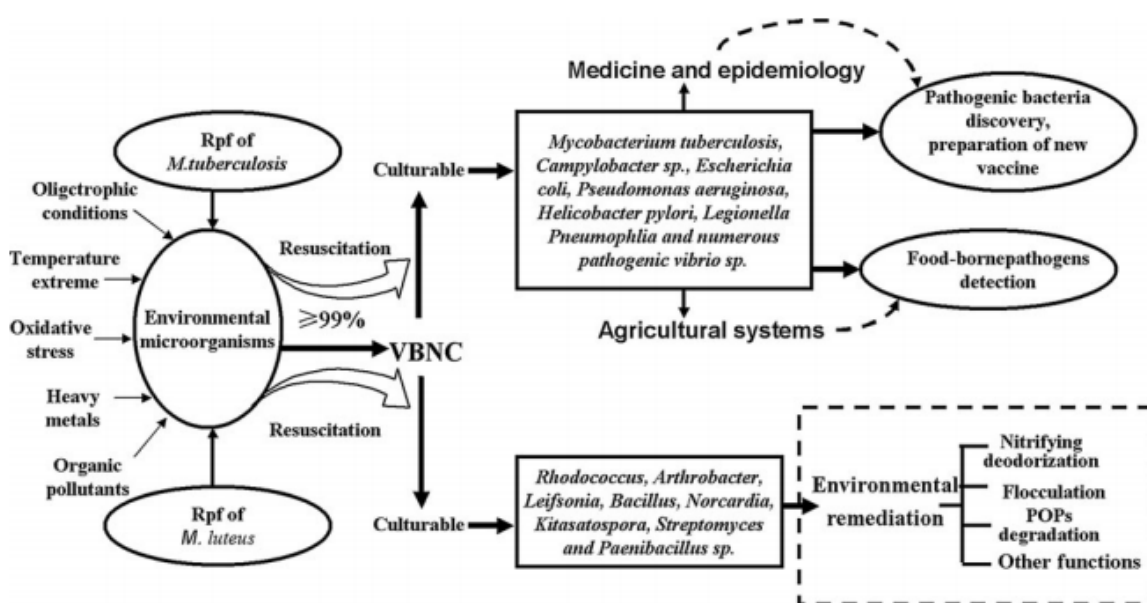


Рис. 1. Применение покоящихся форм бактерий, выделенных из природных местообитаний. Воспроизведено из (Su et al., 2013).

Показано, что искусственно созданные поликультуры, состоящие из очищенных изолятов накопительных культур, являются менее эффективными в деградации полихлорированных дифенилов (ПХД) и дифенилов, чем смешанная культура (Abraham et al., 2002). Возможной причиной является наличие покоящихся форм микроорганизмов в природной поликультуре, имеющих потенциальную способность к разложению полихлорированных дифенилов и дифенилов. Было показано, что при добавлении *grf* эффективность биodeградации ПХД существенно увеличилась (с 17,7% до 81,2%). Из реактивированных образцов были выделены штаммы, не выделявшиеся из исходных образцов (Su et al., 2013). Реактивированные покоящиеся микробные сообщества могут быть рассмотрены как потенциальные агенты ремедиации загрязненных местообитаний.

ГЛАВА 3. МЕТАГЕНОМИКА КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРУДНОРЕАКТИВИРУЕМЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Наличие покоящихся форм микроорганизмов сильно затрудняет экологические исследования, по некоторым данным на настоящее время культивировано всего 0,1 % общего микробного разнообразия биосферы (Aslam et al., 2010). Большую долю микробного разнообразия биосферы обеспечивают почвенные местообитания. Высокая вариабельность экологических факторов и многообразие их сочетаний делают почвенную среду самым большим резервуаром микробного разнообразия на Земле (Daniel, 2005). Один грамм почвы может содержать до 10 миллиардов микроорганизмов, относящихся к тысячам различных видов (Torsvik, Øvreås, 2002). В связи с тем, что при погребении микробное сообщество подвергается различным стрессам, провоцирующим переход клеток в покоящееся состояние, молекулярно-биологические методы исследования могут помочь в более полной характеристике микробного сообщества в таких местообитаниях.

3.1. Метагеномика почвенных сообществ

Один грамм почвы содержит порядка 10^{12} прокариотных генов и 10^9 геномов (Trevors, 2010). Полная характеристика всех этих генов при помощи высокопроизводительного секвенирования пока что недоступна, однако работы по выделению «геномов популяции» из подстилающих пород, где микробная численность, биомасса и разнообразие ниже (Will et al., 2010) достаточно успешны. Метагеномные исследования характеризуют сообщества на основе встречаемости генов и имеют своей целью широко охарактеризовать данные сообщества, хотя на данный момент существует ограниченный спектр физиологических функций, о которых можно судить на основании метагеномного анализа. Почвенная метагеномика подвержена тем же ограничениям, что свойственны всем молекулярно-биологическим техникам (например, касающимся лизиса клеток, извлечения нуклеиновых кислот, стабильности нуклеиновых кислот, извлеченных из клетки и ошибок секвенирования) (Prosser, 2015).

По данным различных молекулярно-генетических исследований почвенное бактериальное сообщество сформировано, в основном филумами *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* и *Firmicutes* (Hansel et al., 2008; Janssen, 2006), доля представителей других филумов (если они вообще присутствуют в почве), как правило, не превышает десятых долей процента (Podar et al., 2007).

Филогенетическое разнообразие прокариот в почве тесно связано с экологическими условиями, такими как pH, влажность и содержание органического углерода. Сильное влияние на филогенетическое разнообразие в почвах оказывает их сельскохозяйственное использование, влияя на микробное сообщество опосредованно через изменение содержания органического вещества и питательных элементов, агрегатного состава, pH и других параметров (Чернов, 2016). Обнаруживаются также сезонные изменения структуры почвенного метабенома, очевидно, обусловленные изменениями температуры и влажности в течение года (Чернов и др., 2015). Таким образом, метабеномный анализ почвенного сообщества может служить инструментом для оценки экологических функций, выполняемых этим сообществом, а также индикатором внешних воздействий, оказываемых на почву.

Развитие почвенной метабеномики, метатранскриптомики и протеомики позволяет использовать их комбинацию для характеристики физиологических стратегий, реализуемых почвенным сообществом. Однако стоит помнить, что присутствие функционального гена вовсе необязательно является доказательством его активности. Организм, несущий ген, может находиться в покоем состоянии или быть активным при экспрессии альтернативных метабелических путей, не требующих функционирования данного гена. Почвенное микробное сообщество содержит множество генов, кодирующих противоположные процессы: например, нитрификация и денитрификация кодируются тем же набором генов и происходят в аэробных и анаэробных условиях, соответственно. Предсказание интенсивности того или иного процесса

исходя из содержания соответствующих генов невозможно без информации о концентрации кислорода и доступности питательных веществ. Более того, один и тот же фермент может принимать участие в нескольких различных физиологических процессах и вносить свой вклад сразу в несколько экологических функций или сам иметь сразу несколько функций. Например, нитритредуктаза *nirK*, осуществляющая превращение нитритов в оксид азота, так же вовлечен в процессы окисления аммония, денитрификации и анаэробного окисления аммония. Моноксигеназа аммония *amoA* может окислять аммоний, так же как и метан и ряд других органических соединений (Arp, Stein, 2003). Таким образом, присутствие *nirK* и *amoA* в метагеноме дают только косвенную информацию о процессах, проводимых почвенным сообществом. В этом заключается сложность перехода от непосредственно информации о геноме к экологическим функциям сообщества в почве (Prosser, 2015).

3.2. Метагеномика погребенных местообитаний

Погребенные местообитания являются природными коллекциями «законсервированной» микробной жизни. Микробные сообщества подповерхностных местообитаний осуществляют широкий спектр метаболических реакций, включая гетеротрофию (в частности в погребенных почвах или отложениях с высоким содержанием органических веществ) и хемолитоавтотрофию, позволяющую фиксировать углерод с использованием энергии окислительно-восстановительных реакций (Emerson et al., 2016; Osburn et al., 2014; Reed et al., 2015). Подповерхностные местообитания не являются подробно исследованными с точки зрения метагеномики, хотя их геномные исследования вносят достаточно большой вклад в открытие новых видов микроорганизмов, которые, в свою очередь, играют большую роль в биогеохимических реакциях, контролирующей эмиссию парниковых газов в атмосферу и разложение погребенного органического вещества (Long et al., 2016).

Метагеномные исследования погребенных местообитаний сосредоточены в основном в области геомикробиологии, изучающей микробные сообщества

глубокозалегающих пород. В таких местообитаниях органический углерод и кислород сильно ограничены, и, поэтому, биodeградация органических веществ производится при помощи микробиологических процессов, конечными продуктами которых являются диоксид углерода и метан. Кроме того, преимущественно анаэробные условия ограничивают спектр метаболических стратегий редукцией нитратов, нитритов, железа (III), марганца (IV), сульфатов или диоксида углерода, служащих в качестве акцепторов электрона (Itvaara et al., 2016). Таким образом, циклы элементов, включающие цикл углерода, водорода, азота, кислорода, фосфора и серы осуществляются микроорганизмами на всем протяжении от поверхности Земли до многих километров вглубь земной коры. Практически весь органический углерод связан в виде микробной биомассы, и, вероятно, функционирование экосистемы на таких глубинах контролируется вирусами, осуществляющими лизис микробных клеток (Labonté et al., 2015; Roux et al., 2014). Лизированная биомасса снова подвергается разложению хемоорганотрофными микроорганизмами на диоксид углерода и метан (Itvaara et al., 2016) и цикл замыкается. Наиболее распространенными филумами в таких местообитаниях являются *Proteobacteria*, также преобладают представители *Firmicutes*, *Tenericutes*, и *Actinobacteria* (Purkamo et al., 2015a; Purkamo et al., 2015b; Sohlberg et al., 2015). Исследование функционального состояния микробиомов глубокопогребенных местообитаний показывают, что, несмотря на то, что большинство микроорганизмов находятся в покоящемся состоянии, реактивация сообщества происходит быстро при появлении источника углерода и энергии.

Метагеномные исследования погребенных почв не проводились в связи с достаточно слабой распространенностью объектов такого типа.

3.3. Метагеномика многолетнемерзлых отложений

Показано, что многолетнемерзлые отложения содержат уникальные наборы генов. Представители доменов Archaea и Bacteria доминируют над эукариотными микроорганизмами. Самыми многочисленными филумами в образцах

многолетнемерзлых отложений являются *Proteobacteria* и *Actinobacteria* (Hultman et al., 2015; Krivushin et al., 2015; Rivkina et al., 2016). Далее по мере уменьшения следуют *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, and *Verrucomicrobia* (Rivkina et al., 2016). Анализ метагеномов активного почвенного слоя и многолетнемерзлых отложений, отобранных на глубине 2 м в регионах Высокой Арктики (Канада) и на Аляске идентифицировал гены, ответственные за водород-зависимый и ацетокластический метаногенез, метилотрофное окисление метана, нитрификацию и деградацию углеводов (Mackelprang et al., 2011; Yergeau et al., 2010). Функциональный анализ образцов многолетней мерзлоты показал, что наиболее широко представлены гены, кодирующие углеводный метаболизм (16-17%), биосинтез аминокислот (13-14%) и метаболизм витаминов и белков (12-13%). Примерно 4% прочтенных последовательностей относились к белкам стресса, преимущественно окислительного (48-52%) и осмотического (12-13%) (Rivkina et al., 2016). Кроме того, протеомика многолетнемерзлых отложений выделяла большую фракцию белков холодового шока, предназначенных для переживания мерзлотных условий, а также белки хемотаксиса и моторные белки, что указывает на то, что, несмотря на условия промерзания, некоторые микроорганизмы сохраняют способность к передвижению. Многолетнемерзлые отложения характеризуются наличием белков-индикаторов проводимых циклов азота, фосфора и серы, что объединяет их с почвами, однако в многолетней мерзлоте данные процессы сильно замедлены, что отражается в снижении экспрессии белков-индикаторов. Также, комбинированные результаты метагеномики и протеомики подтверждают возможность наличия в многолетнемерзлых отложениях диссимилированной редукции Fe (III) как метаболической стратегии (Hultman et al., 2015).

ГЛАВА 4. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись микробные сообщества современной фоновой каштановой остаточно-солонцеватой глубокозасоленной почвы, подкурганных каштановых почв, отобранных на территории погребений и природных образцов многолетнемерзлых пород Антарктиды. Некоторые химические характеристики почв и грунтов приведены Таблице 1.

№ разреза (скважины)	Глубина, см	Возраст почв/отложений, тыс. лет	Сорг, %	pH _{водн.}	Содержание солей, %	CaCO ₃ , %
Каштановая остаточно солонцеватая среднemoshная на лессах (Качалино, современная почва)						
-*	2-10	0	1,16	7,2	0,05	0,4
Каштановая несолонцеватая незасоленная погребенная (курган Саломатино, XVI-XV век до н.э.)						
D-652*	50-61	3,5	0,47	8,3	0,07	1,8
Каштановая остаточно-солонцеватая незасоленная погребенная (курган Перекопка, середина третьего тысячелетия до н.э.)						
E-28*	206-215	4,5	0,14	7,6	0,13	0,8
Вечномерзлые грунты морской террасы, сильно промытые флювиогляциальными водами (о. Кинг-Джордж, станция Беллинсгаузен)						
B1-09	940	7,5	0,28	9,7	0,50	-

Таблица 1. Химические характеристики исследуемых образцов.

* - горизонт A1.

Исследования современной фоновой каштановой остаточно-солонцеватой глубокозасоленной почвы проводились на старозалежном участке, приуроченном к вершине плоского водораздела рек Сакарка и Тишанка (левые притоки Дона), в 5 км к востоку от ст. Качалино Иловлинского района (юг Приволжской

возвышенности). Почвообразующими породами являются лессовидные карбонатные суглинки. Растительный покров представлен разнотравно-полынно-типчаковой ассоциацией. Проектное покрытие 60-70%. Климат региона умеренно континентальный. Среднегодовое количество осадков 380-400 мм, среднегодовая температура 6-8°C.

Исследования погребенных каштановых почв проводились в зоне сухих степей Нижней Волги. Курганный могильник «Саломатино» находится в 5 км к северу от с. Саломатино Камышинского района в краевой плоской части водораздела междуречья рек Иловли и Б. Казанки. Поверхностные отложения до глубины 50-60 см представлены покровными лессовидными опесчаненными суглинками, которые подстилаются делювиальными ожелезненными оглеенными супесчано-суглинистыми породами с включениями гальки, щебня. Абсолютные отметки поверхности 170-175 м. Участок целинный. В растительном покрове доминирует разнотравно-типчаково-ковыльная ассоциация с проектным покрытием 90%. Изученный курган был сооружен в XVI-XV вв. до н.э. или ~3500 лет назад (срубная культура эпохи поздней бронзы). Его высота около 50 см, диаметр 30 м. Подкурганная палеопочва диагностируется как каштановая несолонцеватая незасоленная (разрез Д-652). Ее морфологические и химические свойства, характеристика состояния микробного сообщества дают основания считать, что в 1-й половине II тыс. до н.э. произошла смена экстремально засушливых климатических условий более влажными, причем в XVI-XV вв. до н.э. и в последующие 100-200 лет среднегодовая норма атмосферных осадков превышала современные показатели не менее чем 40-50 мм (Демкин и др., 2012). Курганный могильник «Перекопка» расположен в 2 км к юго-востоку от с. Перекопка Клетского района на краю плакорной части межбалочного водораздела, переходящей далее в пологий склон юго-западной экспозиции. Абсолютные отметки поверхности 100-105 м. Супесчано-суглинистая почвенная толща с 80 см подстилается песчаными отложениями с включениями дресвы и щебня известняка, песчаника. Курганы находятся на старозалежном участке с

восстановившимся естественным растительным покровом. Доминирует полынно-разнотравно-типчаковая ассоциация. Проективное покрытие около 80%. Сооружение изученного кургана датируется серединой III тыс. до н.э. или ~4500 лет назад (катакомбная культура эпохи средней бронзы). Его высота более 2 м, диаметр около 40 м. Подкурганная палеопочва относится к каштановой остаточной-солонцеватой незасоленной (разрез Е-28). Ее морфологические и химические свойства свидетельствуют о том, что в середине III тыс. до н.э. климатические условия в регионе были более засушливыми по сравнению с современностью (Демкин, Борисов, Удальцов, 2010).

Изучаемые образцы многолетнемерзлых пород Антарктиды представляют собой отложения морской террасы о. Кинг-Джордж (ст. Беллинсгаузен), сильно промытые флювиогляциальными водами. Температура на станции колеблется от -8,2 до 0,5, что в среднем составляет -3,850С. В соответствии с данными статистических характеристик эмпирических распределений атмосферного давления по месяцам средний показатель давления за год имеет величину 991,24 Па. Перепады давления незначительные: от 987,80 по 995,10 Па. Скорость ветра на станции изменяется в пределах 5,30- 7,80 м/с, в среднем составляя 6,85 м/с. Возраст исследуемых отложений составляет 7,5 тыс. лет, а льдистость колеблется от 10 до 36 %. Образцы были получены из скважины В1-09 глубиной 9 м. Содержание органического углерода - около 0,3%.

4.2. Методы исследования

Инициирование микробной сукцессии

Структура гидролитического микробного комплекса в исследуемых образцах определялась методом микрокосмов с инициированием микробной сукцессии увлажнением и внесением очищенного хитина (ICN Biomedicals, Германия) в концентрации 0,2%. Для образцов многолетнемерзлых грунтов дополнительно проводился комплекс процедур, направленных на регидратацию клеток, их отмывку от аутоиндукторов анабиоза (в дистиллированной воде и 5% растворе пиррофосфата калия) и активацию клеточного метаболизма (добавкой

метилрезорцина, (50 мкг/мл); дрожжевого автолизата, (5% вес/объем, навеска почвы составляла 5 г.), как описано ранее (Кряжевских и др., 2012). В качестве контроля использовалась почва или грунт без субстрата, увлажненная водой. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Изучение динамики эмиссии диоксида углерода из исследуемых образцов газохроматографическим методом

Изучение эмиссии диоксида углерода проводилось на газовом хроматографе с детектором по теплопроводности. Навеску почвы (5 г) помещали в пенициллиновые флаконы, увлажняли до 60% (оптимального значения влажности для жизнедеятельности большинства микроорганизмов) (1 мл суспензии хитина/пектина, 2 г в 100 мл воды). Накопление диоксида углерода в газовой фазе над образцами оценивали спустя сутки инкубации при постоянной температуре 23°C. Контролем служил образец, увлажненный водой. Опыт проводили в течение 10 суток. Для образцов многолетнемерзлых грунтов измерения эмиссии CO₂ не проводилось.

Определение динамики численности разных групп микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии

Определение численности бактерий, длины мицелия актиномицетов и грибов, а также их биомассы осуществляли с помощью метода люминесцентной микроскопии.

Контролем явились образцы, увлажненные водой. Определение осуществляли на нулевые, третьи, десятые сутки. Опыт проводили в течение 10 дней.

1. Почвенную суспензию (1 : 100) обрабатывали на ультразвуковой установке УЗДН-1 (3 мин., сила тока 0,40А, частота-15кГц).

2. Суспензию наносили микропипеткой на тщательно обезжиренное предметное стекло (0,01 мл для определения бактерий, 0,02 мл для грибов) и равномерно распределяли петлей на площади 4 см² (квадрат 2х2 см).

3. Препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. Затем после фиксации легким нагреванием на пламени газовой горелки окрашивали препараты водным раствором акридина оранжевого (разведение 1:10000; 2-4 мин) – для окрашивания бактерий и раствором калькофлуора белого (разведении 1:10000; 15 мин) для грибов.

4. Избыток флуорохрома удаляли в процессе промывки, для чего стекла погружали на 10 мин в стакан или кювету с водопроводной водой. Окрашенные препараты высушивали при комнатной температуре.

5. Для микроскопии на препарат наносили каплю, воды и покрывали обезжиренным покровным стеклом. Лишнюю воду удаляли фильтровальной бумагой. Препараты просматривали на люминесцентном микроскопе (Axio Scope 2 plus, Zeiss, Германия)

Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы/грунта, вычисляли по формуле:

$$N = S_1 * a * n / v * S_2 * c \quad (1)$$

где N - число клеток (длина мицелия, мкм) на 1 г почвы; S_1 - площадь препарата (мкм^2); a – количество клеток (длина мицелия, мкм) в одном поле зрения (усреднение производилось по всем препаратам); n – показатель разведения почвенной суспензии (мл); v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь полей зрения микроскопа (мкм^2); c – навеска образца (г).

Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см^3 , а содержание воды в клетках – 80%. Показатели сухой биомассы для одной бактериальной клетки объемом $0,1 \text{ мкм}^3$ – $2 * 10^{-14} \text{ г}$, для 1 м мицелия актиномицетов диаметром $0,5 \text{ мкм}$ – $3,9 * 10^{-8} \text{ г}$. Показатели сухой биомассы 1 м грибного мицелия с условным диаметром 5 мкм – $3,9 * 10^{-6} \text{ г}$ (Кожевин, 1989). С учетом замеренного диаметра мицелия грибов биомассу вычисляли по формуле (для мицелия – $0,628r^2 * 10^{-6} \text{ г}$) (Полянская, 1996).

Определение филогенетической структуры метаболически активной прокариотной компоненты исследуемых микрокосмов молекулярно-биологическим методом гибридизации клеток *in situ* (FISH)

Оценку разнообразия и численности метаболически активных представителей отдельных филогенетических групп хитинолитических микроорганизмов рассматриваемых образцов проводили с помощью метода *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) (Amann, Ludwig, 2000), модифицированного для работы с почвой (Манучарова и др., 2011). Метод FISH широко применяется для исследования микробных сообществ в различных экосистемах минуя стадию культивирования (Панкратов, Белова, Дедыш, 2005; Amann, Krumholz, Stahl, 1990; Bertaux et al., 2007; Dedysh et al., 2006; Eickhorst, Tippkötter, 2008; Ginige et al., 2004; Manz et al., 1996; Neef et al., 1998; Rabus et al., 1999; Wagner, Horn, Daims, 2003). Данная техника позволяет одновременно производить молекулярную идентификацию, определение численности и локализацию физиологически активных клеток бактерий в природных образцах *in situ*, что является ее преимуществом перед фингерпринт методами анализа, таких как T-RFLP, DGGE и анализ профилей жирных кислот.

В настоящей работе был применен спектр зондов, специфичных для представителей доменов Archaea и Bacteria, а также отдельных филогенетических групп Bacteria, что позволило осуществить анализ бактериального сообщества рассматриваемых почв. Использование метода FISH позволило учесть живые, метаболически активные клетки в почвенных образцах с полисахаридами и без них.

1. Почвенную суспензию (1:10) обрабатывали ультразвуком (2 мин., сила тока 0,40 А, частота 22 кГц). Клетки микроорганизмов отделяли от крупных частичек почвы трехкратным центрифугированием при 1 тыс оборотов в течение 10 минут. Суспензию, полученную за три цикла обработки, центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 мин. Полученный осадок заливали стерильной дистиллированной водой до объема 2 мл.

2. Фиксацию образцов осуществляли с использованием формальдегида в качестве фиксирующего агента. 2 мл суспензии центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин., полученный осадок ресуспензировали в 0,5 мл фосфатного буфера (NaCl – 8,0 г, KCl – 0,2 г, Na_2HPO_4 – 1,44 г, NaH_2PO_4 – 0,2 г, H_2O – 1 л, pH 7,0) и добавляли 1,5 мл 4% раствора формальдегида в фосфатном буфере. Инкубировали при комнатной температуре на качалке в течение 1,5 час. Фиксированный материал собирали центрифугированием (8000 об./мин. в течение 2 мин.), промывали два раза фосфатным буфером, ресуспензировали в смеси этанола и фосфатного буфера (1:1) и до анализа хранили при -20°C .

3. 1 мкл суспензии фиксированного образца наносили на предметные стекла для гибридизации с окошками, разделенными тефлоновым покрытием. Нанесенные на стёкла фиксированные препараты клеток обрабатывали раствором лизоцима (10 мг в 1 мл 0,05 М EDTA и 0,1 М TRIS HCl, 1:1, pH 8,0) для увеличения проницаемости клеточных стенок бактерий. Полученные препараты выдерживали в течение 12-24 часов при комнатной температуре или в течение 1 часа при 37°C и затем обрабатывали последовательно в серии растворов этанола (50%, 80% и 100%). Для гибридизации использовали набор рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов, разработанных ранее для детекции представителей доменов Bacteria и Archaea, а также отдельных филогенетических групп в пределах Bacteria (Таблица 2). Синтез зондов, меченных флуоресцентным красителем Cy3, осуществлялся компанией Синтол (Москва, Россия). Гибридизацию препаратов с флуоресцентно-мечеными зондами проводили в соответствии с методикой (Amann, Ludwig, Schleifer, 1995) при температуре 46°C . Условия гибридизации, использованные для различных зондов, концентрация формамида в гибридизационном буфере и концентрация NaCl в буфере для промывки приведены в Таблице 2.

4. Препараты анализировали с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS Microscope Axio Scope 2 plus (Германия) со светофильтрами Filter set 15. Численность целевых групп микроорганизмов в образцах определяли путем учета количества гибридизованных с зондами клеток в 30 полях зрения микроскопа на

одной ячейке, с последующим расчетом численности соответствующих популяций на 1 г почвы/грунта (см. формулу (1))

Зонд	Целевая группа организмов	Целевой участок 16S рРНК	Нуклеотидная последовательность зонда (5'-3')	Формамид, % ^a	NaCl, mM ^b
EUB338 I EUB338 II EUB338III	Bacteria Bacteria (<i>Planctomycetales</i>) Bacteria (<i>Verrucomicrobiales</i>)	338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	20	225
ARCH915 ARC344	Archaea	915-934 344-363	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT TCG CGC CTG CTG C ^c CCC GT	30	112
ALFIb ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i>	19-35 968-986	CGT TCG YTC TGA GCC AG ^b GGT AAG GTT CTG CGC GTT	20	225
BET42a	<i>Betaproteobacteria</i>	1027-1043 ^f	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	80
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	1027-1043 ^f	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	80
SRB385Db	<i>Deltaproteobacteria</i>	385-402	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	20	225
CF319a CFB560	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	319-336 560-575	TGG TCC GTG TCT CAG TAC WCC CTT TAA ACC CAR T	35 30	80 112
HGC69a	<i>Actinobacteria</i>	1901-1918 ^f	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	25	159
LGC354A, LGC354B, LGC354C ^c	<i>Firmicutes</i>	354-371	TGG GAA GAT TCC CTA CTG C, CGG GAA GAT TCC CTA CTG C, CCG GAA GAT TCC CTA CTG C	35	80
Ver138 Ver1455	<i>Verrucomicrobia</i>	138-155 1455-1472	CGA GCT ATT CCC CTC TTG CCA TCC ATA CCT TCG GCA	10	450

Таблица 2. Примененные в настоящем исследовании рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды. Воспроизведено из (Власенко, 2011)

^a - концентрация формамида в гибридизационном буфере

^b - концентрация NaCl в буфере для промывки

^c - Y = C или T, W = A или T, R = A или G

^f - целевая молекула—23 S рРНК

^d - зонд используется в сочетании с немеченным олигонуклеотидом 5'-TATAGTTACGGCCGCGT-3'

^e - эквимольная смесь трех меченных олигонуклеотидов.

Выделение доминантов прокариотного гидролитического сообщества на питательные среды

Выделение доминантов прокариотного гидролитического сообщества проводили методом посева на плотные питательные среды следующего состава (г/л): коллоидный хитин/ пектин – 4; KH_2PO_4 – 0,3; K_2HPO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; агар – 20.

Для выделения мицелиальных прокариот в чистую культуру и дальнейшего культивирования использовали среду овсяный агар или среду Гаузе 2 (Гаузе и др., 1983; Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994). Каждый выделенный штамм нумеровали, и в дальнейшем проводили его идентификацию, используя фенотипические (культуральные, морфологические и хемотаксономические признаки) и молекулярно-генетические методы. Для выделения одноклеточных прокариот в чистую культуру и дальнейшего культивирования использовали среду RICH, идентификацию проводили молекулярно-генетическими методами.

Использовали следующие определители и работы (Терехова и др., 1990; Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994).

Изучение филогенетического положения исследованных штаммов микроорганизмов на основании секвенирования гена 16S рРНК проводили совместно с Центром «Биоинженерия» РАН.

Для выделения ДНК из чистых культур микроорганизмов применяли PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., США), руководствуясь инструкциями производителя. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система.

Состав реакционной смеси для ПЦР:

Праймеры – по 25 пмоль каждого;

10X буфер – 2,5 мкл;

2 mM dNTP – 2,5 мкл;

BioTaq полимеразы («Диалат», Москва, 5Е/мкл) – 0,2 мкл;

ДНК-матрица – 50 нг;

H₂O – до 25 мкл.

Реакцию проводили по следующей схеме: 30 циклов: 94°C – 0,5 мин; 45°C – 1 мин, 72°C – 1 мин; окончательная полимеризация – 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Фотографирование полученных данных проводили при помощи системы видеодокументации BioDocII, производство Biometra, Германия. Выделение, очистку и секвенирование продуктов ПЦР проводили в Центре «Биоинженерия» РАН с использованием автоматического капиллярного секвенатора (Silver Sequence d/ddNTP Mixes, Promega, США).

Обработку результатов секвенирования проводили при помощи программного обеспечения BioEdit (Ibis Biosciences) и Mega 7 (Kumar, Stecher, Tamura, 2016). Идентификация последовательностей производилась при помощи базы данных NCBI BLAST (Database resources of the National Center for Biotechnology Information, 2013). Выравнивание последовательностей производилось при помощи программного обеспечения MAFFT (Yamada, Tomii, Katoh, 2016). Построение филогенетических деревьев производилось методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987), статистический анализ достоверности ветвления оценен методом Bootstrap-анализа 500 альтернативных деревьев (Felsenstein, 1985). Эволюционные расстояния рассчитаны при помощи Maximum Composite Likelihood (Tamura, Nei, Kumar, 2004) и масштаб выражен в количестве нуклеотидных замен на 1000 нуклеотидов.

Приготовление препарата почвенной ДНК

Образец почвы/грунта, весом 0,25 г помещали в пробирку Bead Solution, содержащую лизирующий буфер (SDS) и стеклянные шарики и встряхивали на вортексе в течение нескольких минут. Затем проводили последовательную отмывку ДНК при помощи буферов C1-C4 из набора PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., США) с последовательным отделением супернатанта, центрифугированием и инкубацией при 4°C. Затем фильтровали полученную суспензию на колонке с фильтром, промывали раствором C5 из

набора и переводили в раствор буфером С6 без ЭДТА. Образцы выделенной ДНК хранились при -20°C до момента дальнейшего использования.

Секвенирование нового поколения и метагеномный анализ

Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, комплементарных последовательностям как бактерий, так и архей: PRK341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (GGACTACYVGGGTATCTAAT). Полученные ПЦР-фрагменты очищали на колонках QIAquick (согласно протоколу производителя). Каждый ПЦР-фрагмент был растворен в 50 мкл ТЕ-буфера, полученного материала было достаточно для дальнейшего анализа. Пиросеквенирование полученных ампликонов проводили с использованием прибора GS FLX (Roche, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ и пикотитровальной пластины GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70-75. Были получены ПЦР-фрагменты препаратов метагеномной ДНК с помощью вырожденных праймеров PRK341F и PRK806R, созданы библиотеки, пригодные для секвенирования и далее определены нуклеотидные последовательности переменных фрагментов генов 16s рРНК при помощи пиросеквенатора. Анализ полученных данных проводился при помощи Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (Caporaso et al., 2010). При помощи инструментов программы осуществлялись:

- 1) проверка качества секвенирования и создание библиотеки сиквенсов;
- 2) формирование ОТЕ (OTU picking) de novo на основе 97%, 94%, 91%, 88%, 85%, 81% порога сходства сиквенсов методом UCLUST (Edgar, 2010);
- 3) удаление синглтонов («singletons» – ОТЕ, содержащих только один сиквенс) и последовательностей, относящихся к растительным хлоропластам;
- 4) Определение филогенетического состава сообществ на разных таксономических уровнях при помощи базы данных разнообразия гена RDP classifier (Wang et al., 2007) и построения филогенетического дерева при помощи алгоритма FastTree (Price, Dehal, Arkin, 2010);
- 5) Расчет показателей общего разнообразия прокариотных сообществ (альфа-разнообразия): видового богатства, индекса Шеннона ($H = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i — доля

i-го вида в сообществе), индекса Chao1, оценивающего предположительное реальное количество ОТЕ в сообществе ($Chao1 = Sobs + a^2/2b$, где Sobs — число обнаруженных ОТЕ, а — число ОТЕ, содержащих 1 сиквенс, b — число ОТЕ, содержащих 2 сиквенса), индекса филогенетического разнообразия (PD) (Faith, Baker, 2006). При расчете индексов разнообразия проводилась нормализация данных по образцу с минимальным числом полученных сиквенсов.

б) Анализ сходства структуры бактериальных сообществ (бетаразнообразия) при помощи метрики Брея-Кертиса (Bray, Curtis, 1957). Визуализация результатов анализа бетаразнообразия проводилась при помощи построения двумерных диаграмм по методу главных компонент. Статистический анализ достоверности различий между группами проводился при помощи непараметрического метода permutational ANOVA/MANOVA (PERMANOVA) (Anderson, 2001).

Относительная доля родов в образцах представляет собой отношение количества последовательностей, относящихся к таксону, к общему количеству прочтенных последовательностей в образце после нормализации. Поскольку было проанализировано большое количество последовательностей, относившихся к различным родам прокариот, была произведена выборка доминантных родов, относительная доля которых в образцах была равна или превышала 1%.

Функциональное разнообразие генов в микробных сообществах было предсказано при помощи программы PICRUSt (Langille et al., 2013). Процесс предсказания функциональных генов по результатам секвенирования 16s рРНК состоял из двух этапов. На первом этапе производилось предсказание встречаемости генов для каждого отдельно взятого организма согласно референсному филогенетическому древу Greengenes phylogenetic tree of 16S sequences (DeSantis et al., 2006). Затем производилось сопоставление предсказанных генов для каждого таксона с относительной встречаемостью данного таксона в образце, оцененному по 16s рРНК (Рис. 2). Таким образом осуществлялась оценка встречаемости гена в образце. Для сопоставления 16s рРНК с уже секвенированными полными геномами была использована база бактериальных и архейных геномов IMG database (Markowitz et al., 2012).

Функциональная классификация производилась согласно классификационной схеме Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Orthology (KOs) (Kanehisa et al., 2012).

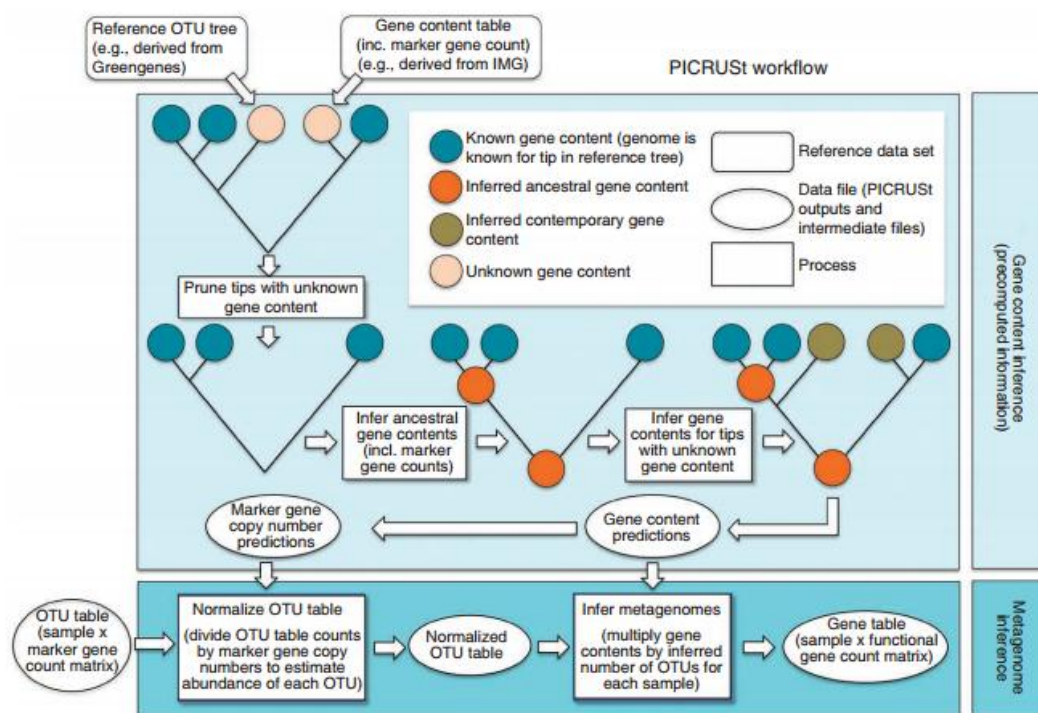


Рис. 2. Схема осуществления предикции функций микробного сообщества по результатам высокопроизводительного секвенирования гена 16s рРНК (воспроизведено из (Langille et al., 2013)).

Дальнейшая обработка результатов производилась в программе QIIME (Caporaso et al., 2010). При помощи инструментов программы осуществлялось удаление синглтонов и нормализация данных по образцу с наименьшим количеством определенных генов.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Динамика эмиссии диоксида углерода из почв и грунтов при внесении полисахаридов

С целью оценки гидролиза хитина или пектина в почве микроорганизмами как источника углерода был применен метод инициации сукцессии увлажнением и внесением исследуемых субстратов. Контролем служили образцы, увлажненные водой. Интенсивность эмиссии CO_2 в контроле определялась скоростью разложения присутствующего в почве органического вещества. Показателями использования субстратов (хитина и пектина) были значения активности эмиссии диоксида углерода и накопление биомассы в ходе сукцессии.

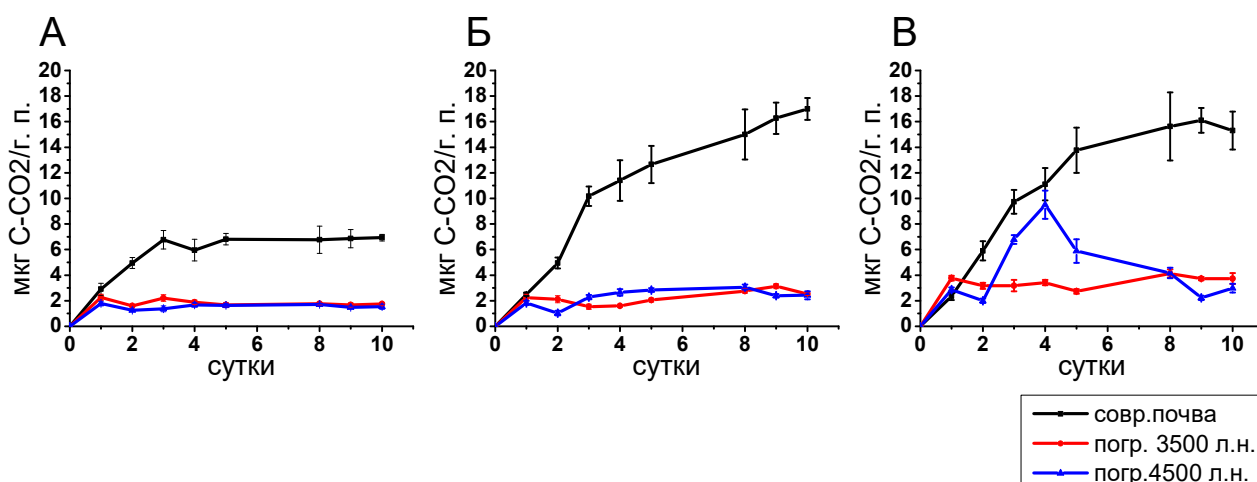


Рис. 3. Динамика эмиссии CO_2 при увлажнении из образцов погребенных и современной каштановой почвы: А – при увлажнении (контроль); Б – при инкубации с хитином; В – при инкубации с пектином. Приведены средние значения в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Динамика эмиссии CO_2 в увлажненных образцах почвы закономерно снижалась по мере удаления от поверхности (Рис. 3, А). Сравнивая образцы палеопочв между собой, следует отметить, что опытные варианты по сравнению с контролем в более древнем образце реагировали на внесение пектина гораздо более резко (больше в 3-5 раз), чем образцы более современного времени погребения, залегающие менее глубоко по профилю (Рис. 3, Б-В). Можно предположить, что это связано с глубиной залегания и возрастом образцов почвы, которые коррелируют со степенью минерализованности гумусовых веществ.

Более древние почвы образца характеризуются более низким содержанием гумуса и, поэтому, активнее реагируют на внесение органических веществ.

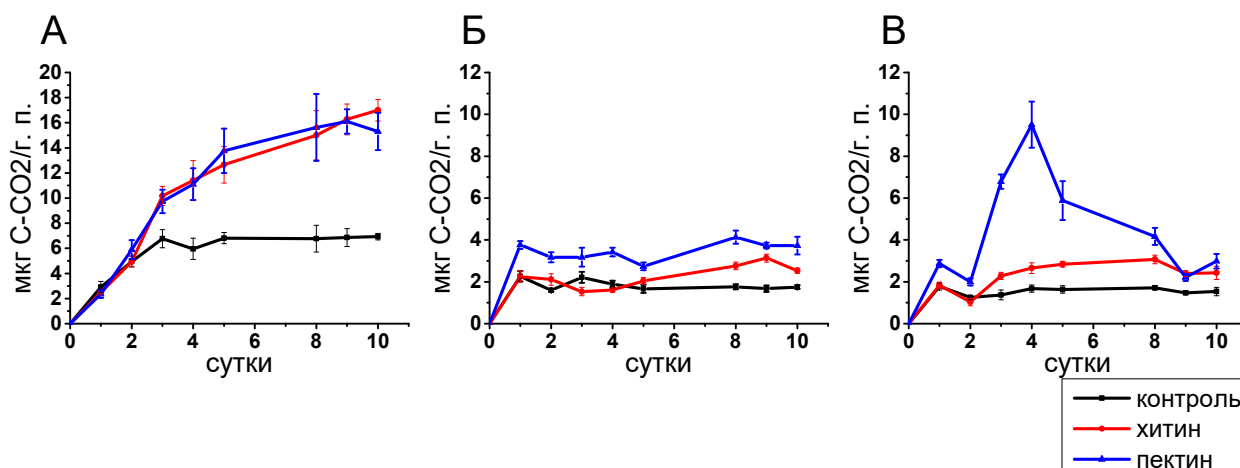


Рис. 4. Динамика эмиссии CO₂ при увлажнении из образцов погребенных и современной каштановой почвы при инкубации с различными субстратами: А – современная каштановая почва; Б – каштановая почва, погребенная ~3500 л.н.; В – каштановая почва, погребенная ~4500 л.н. Приведены средние значения в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Значения эмиссии диоксида углерода из образцов погребенных почв с полисахаридом были выше по сравнению с контролем (Рис. 4). Причем эмиссия CO₂ между вариантами с хитином и с пектином отличалась достаточно значительно в образцах исследуемых почв. Так, в образце, погребенном 4500 л.н. (глубина залегания 206-215 см) к четвертым суткам эксперимента эмиссия CO₂ из почвы, инкубировавшейся с пектином, достигала 9,5 мкг CO₂/г.п., что превышает больше чем в 5 раз эмиссию из контрольных образцов и сопоставимо с величиной эмиссии из современных почв, в то время как образцы с хитином отличались от контроля достоверно, но незначительно (Таблица 3). Пик дыхательной активности в образцах с пектином наблюдался примерно на 4 сутки эксперимента, с хитином примерно на 8-10 сутки. Высокие значения показателя при добавлении субстрата говорят о высокой потенциальной активности древних микробных комплексов.

N=5	сутки	контроль	хитин	пектин	P _{st} (контроль- хитин)	P _{st} (контроль- пектин)
		среднее±SD	среднее±SD	среднее±SD		
совр. почва	1	2,9±0,5	2,5±0,1	2,4±0,3	НД	0,034
	2	5,0±0,4	5,0±0,4	5,9±0,8	НД	0,037
	3	6,8±0,7	10,2±0,8	9,7±0,9	0,003	0,002
	4	6,0±0,8	11,4±1,6	11,1±1,3	0,007	0,002
	5	6,8±0,5	12,7±1,5	13,8±1,8	0,01	0,012
	8	6,8±1,1	15,0±2,0	15,6±2,7	0,004	0,010
	9	6,9±0,7	16,3±1,2	16,1±1,0	0,001	<0,001
	10	6,9±0,3	17,0±0,9	15,3±1,5	0,001	0,007
погр. 3500 л.н.	1	2,3±0,2	2,2±0,3	3,8±0,2	НД	<0,001
	2	1,6±0,1	2,1±0,3	3,2±0,2	НД	0,005
	3	2,2±0,3	1,5±0,2	3,2±0,4	0,003	0,013
	4	1,9±0,2	1,6±0,1	3,4±0,2	0,025	<0,001
	5	1,7±0,2	2,0±0,2	2,7±0,2	0,014	<0,001
	8	1,8±0,1	2,8±0,2	4,1±0,3	0,001	0,003
	9	1,7±0,2	3,1±0,2	3,7±0,1	<0,001	<0,001
	10	1,7±0,1	2,5±0,1	3,7±0,4	<0,001	0,010
погр. 4500 л.н.	1	1,8±0,2	1,8±0,2	2,9±0,2	0,033	0,002
	2	1,3±0,1	1,0±0,2	2,0±0,2	НД	0,007
	3	1,4±0,2	2,3±0,2	6,8±0,3	0,003	<0,001
	4	1,7±0,2	2,7±0,3	9,5±1,1	0,003	0,005
	5	1,6±0,2	2,8±0,1	5,9±0,9	<0,001	0,010
	8	1,7±0,1	3,1±0,2	4,2±0,4	0,003	0,006
	9	1,5±0,1	2,4±0,1	2,2±0,2	0,002	0,004
	10	1,5±0,2	2,4±0,3	3,0±0,3	0,006	0,004

Таблица 3. Динамика эмиссии CO₂ при увлажнении из образцов погребенных и современной каштановой почвы при инкубации с различными субстратами. Статистический анализ достоверности различий между образцами с субстратом и увлажненными образцами проводился с помощью парного t-критерия Стьюдента (N=5). В таблице приведены значения

P_{st} , статистически достоверными признаются различия, при которых $P_{st} < 0,05$. НД – недостоверные различия.

По абсолютным значениям эмиссии CO_2 из почвы можно судить о динамике развития хитинолитической микробной сукцессии, но не об интенсивности разложения субстрата в почвах. В связи с этим нами был рассчитан коэффициент трансформации хитина (КТХ) и коэффициент трансформации пектина (КТП), которые представляют собой отношение эмиссии диоксида углерода в образцах почв с соответствующим полисахаридом (a) к контрольным вариантам (a_o):

$$КТХ(КТП) = a/a_{om}$$

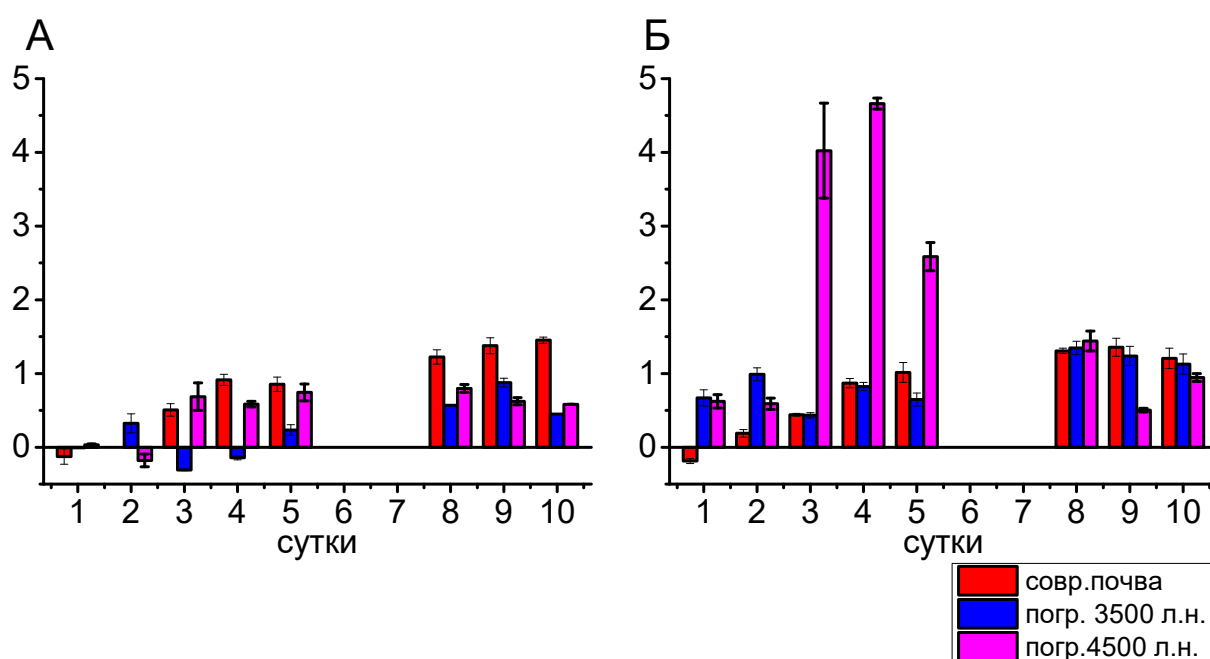


Рис. 5. Динамика КТХотн. (А) и КТПотн. (Б) из образцов погребенных и современной каштановой почвы. Приведены средние значения в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Коэффициент трансформации хитина в погребенных почвах сравним с непогребенными каштановыми почвами (Рис. 5). Во всех образцах КТХ возрастает к 8-10 суткам, затем стабилизируется. Рассмотрение коэффициента трансформации пектина показало, что интенсивность разложения выше в образце более древнего времени погребения более чем в 3 раза, по сравнению с образцами современных и погребенных почв более позднего времени погребения. Коэффициент трансформации пектина в образце более позднего времени

погребения относительно стабилен, что позволяет судить о достаточно низком уровне развития пектинолитического комплекса данных почв.

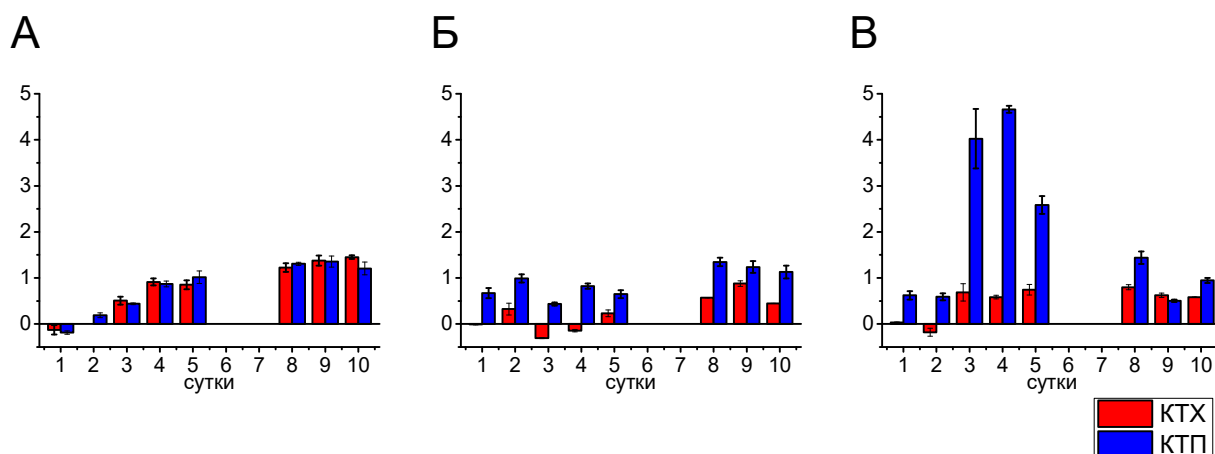


Рис. 6. Динамика КТХотн. и КТПотн. из образцов: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н. Приведены средние значения в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Сравнивая коэффициенты трансформации хитина и пектина из образцов палеопочв, следует отметить, что в обоих образцах показатели на пектине выше, чем показатели на хитине (Рис. 6). Этот факт можно объяснить тем, что пектин является более легкодоступным полисахаридом.

В целом, можно сделать вывод о том, что интенсивность трансформации полисахаридов в погребенных почвах сопоставима или превышает таковую в образцах современных почв.

5.2. Динамика общей численности и биомассы микроорганизмов в почвах и грунтах при внесении полисахаридов

Общая численность и биомасса прокариотных микроорганизмов была оценена при помощи метода прямой люминесцентной микроскопии.

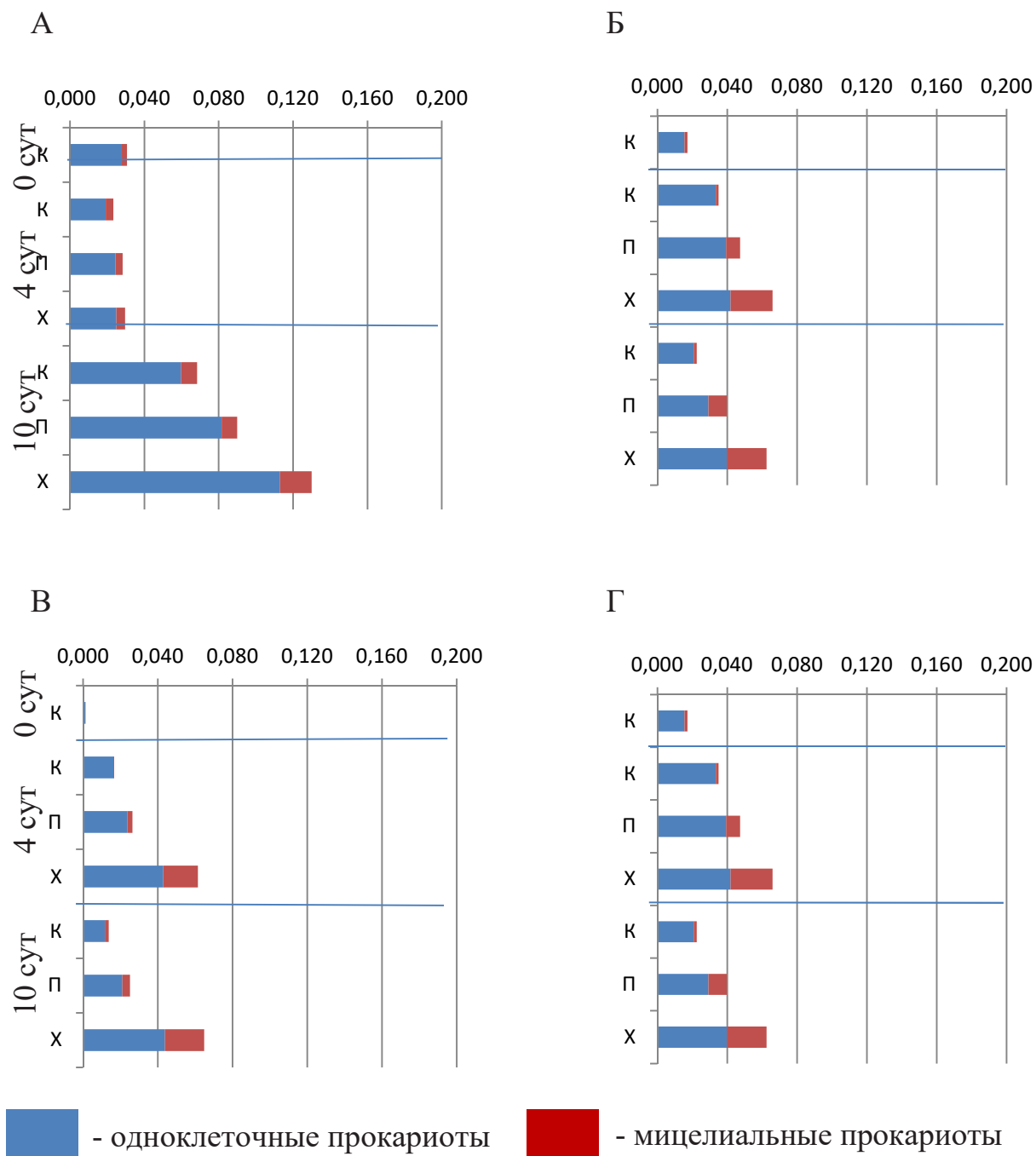


Рис. 7. Динамика прокариотной микробной биомассы в исследуемых образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта. Приведены средние значения (мг/ г.п.) в каждой точке эксперимента. К – почва, увлажненная водой; П – почва, инкубированная с пектином; Х – почва, инкубированная с хитином

Общая прокариотная биомасса микроорганизмов в современной каштановой почве была сопоставима с погребенными почвами и грунтами (Рис. 7). Биомасса прокариотных микроорганизмов возрастала при внесении полисахаридов по сравнению с контролем. Максимальная биомасса наблюдалась на 10 сутки сукцессии в контроле и при внесении хитина в обоих образцах. Рассматривая динамику биомассы исследуемых почв, следует отметить, что порядок абсолютных величин в обоих образцах примерно одинаков, однако образцы погребенных почв гораздо лучше откликаются на внесение органического вещества (биомасса на полисахариде возрастает по сравнению с контролем в 5-7 раз), чем образцы современных почв, что совпадает с данными по эмиссии CO_2 и подтверждает гипотезу о зависимости между степенью «законсервированности» микробного сообщества и реакцией на внесение субстрата. Чем меньше приток питательных веществ и влаги, тем более резко происходит наращивание микробной биомассы при внесении питательного субстрата.

Проводя анализ между двумя исследуемыми субстратами, следует сказать, что в обеих почвах прокариотная биомасса при внесении хитина была выше, чем при внесении пектина. Это предположительно связано с тем, что в связи с погребением, пектин не является привычным субстратом для микробного сообщества погребенных почв, а так же с тем, что хитин является природным источником азота для жизнедеятельности почвенной биоты. Отсутствие корреляции между интенсивностью почвенного дыхания и наращиванием биомассы может быть объяснено стремительным развитием актиномицетного комплекса на хитине, при относительно малом вкладе мицелиальных прокариот в эмиссию CO_2 из почвы (например, по сравнению с грибами).

Исследуемые образцы резко отличались по структуре микробного комплекса. При увлажнении образца к 10 суткам сукцессии наблюдалось увеличение доли прокариотных организмов от всех учитываемой микробной биомассы (включающей в себя одноклеточных и мицелиальных прокариот и грибной

мицелий) (Рис. 8). В данной работе споровая грибная биомасса не учитывалась.

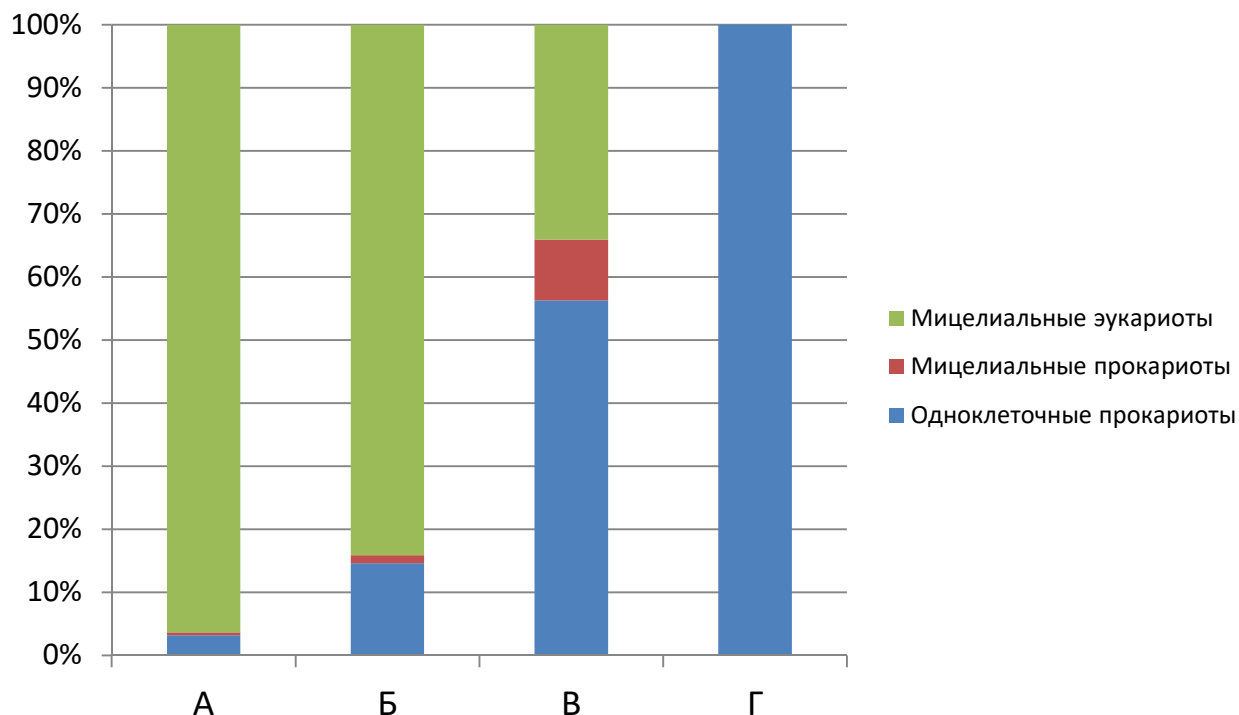


Рис. 8. Структура микробного комплекса исследуемых образцов (при увлажнении) на 10 сутки эксперимента: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта.

Структура почвенного микробного комплекса с преобладанием прокариот уже отмечалась ранее исследователями. Так, в кандидатской диссертации Алехиной Л. К. было показано, что в дерново-глеевых почвах биомасса прокариот достигает 50% от общей биомассы. Это связано по предположению авторов с тем, что практически все поры (70%) в дерново-глеевой почве представлены ультрамикропорами размером менее 5 мкм. В таких условиях микромицеты с толстыми гифами развиваются с трудом, так как им не хватает пространства для жизнедеятельности, а те грибы, которые все-таки присутствуют в этой почве, формируют тонкий мицелий. В дерново-глеевой почве складываются неблагоприятные условия для развития мицелиальных форм микроорганизмов и благоприятные для размножения в них одноклеточных бактерий. Бактерии выступают в роли «дублеров», осуществляющих те экологические функции, которые выполняют в других почвах мицелиальные микроорганизмы (Алехина, 2001).

Также, в работе Головченко А. В., Добровольской Т. Г., Звягинцева Д. Г. было показано, что в низинных высокозольных торфяниках доля бактериальной биомассы превышала долю грибной. Исследователи связали данный факт также с преобладанием в поровом пространстве ультрамикропор, в которых развитие грибов проблематично. В исследованных торфяниках грибы находятся в жизнеспособном состоянии по всему профилю, однако, лишь в пределах метровой толщи их гифы обладают способностью прорасти. Глубже метровой отметки propagулы грибов скорее всего хранятся в почвенном профиле как пул, т.е. в состоянии анабиоза, поддерживая на высоком уровне запасы живого углерода в экосистеме. В то же время, численность бактерий и актиномицетного мицелия в глубинных слоях может быть такой же или даже выше, чем в верхних горизонтах (Головченко, Добровольская, Звягинцев, 2008).

Для многолетнемерзлых грунтов Антарктиды отсутствие грибной биомассы закономерно и показано предыдущими исследованиями антарктических почв и грунтов (Марфенина, Никитин, Иванова, 2016). Для антарктических местообитаний характерно преобладание споровой биомассы над мицелиальной. Абсолютные значения эукариотной биомассы в примитивных почвах Антарктиды достигают всего лишь 0,6 мг/г.п. Принимая во внимание то, что исследование производилось не в почвах, а в погребенных многолетнемерзлых грунтах, отобранных на глубине 9 м, отсутствие грибной биомассы представляется объяснимым.

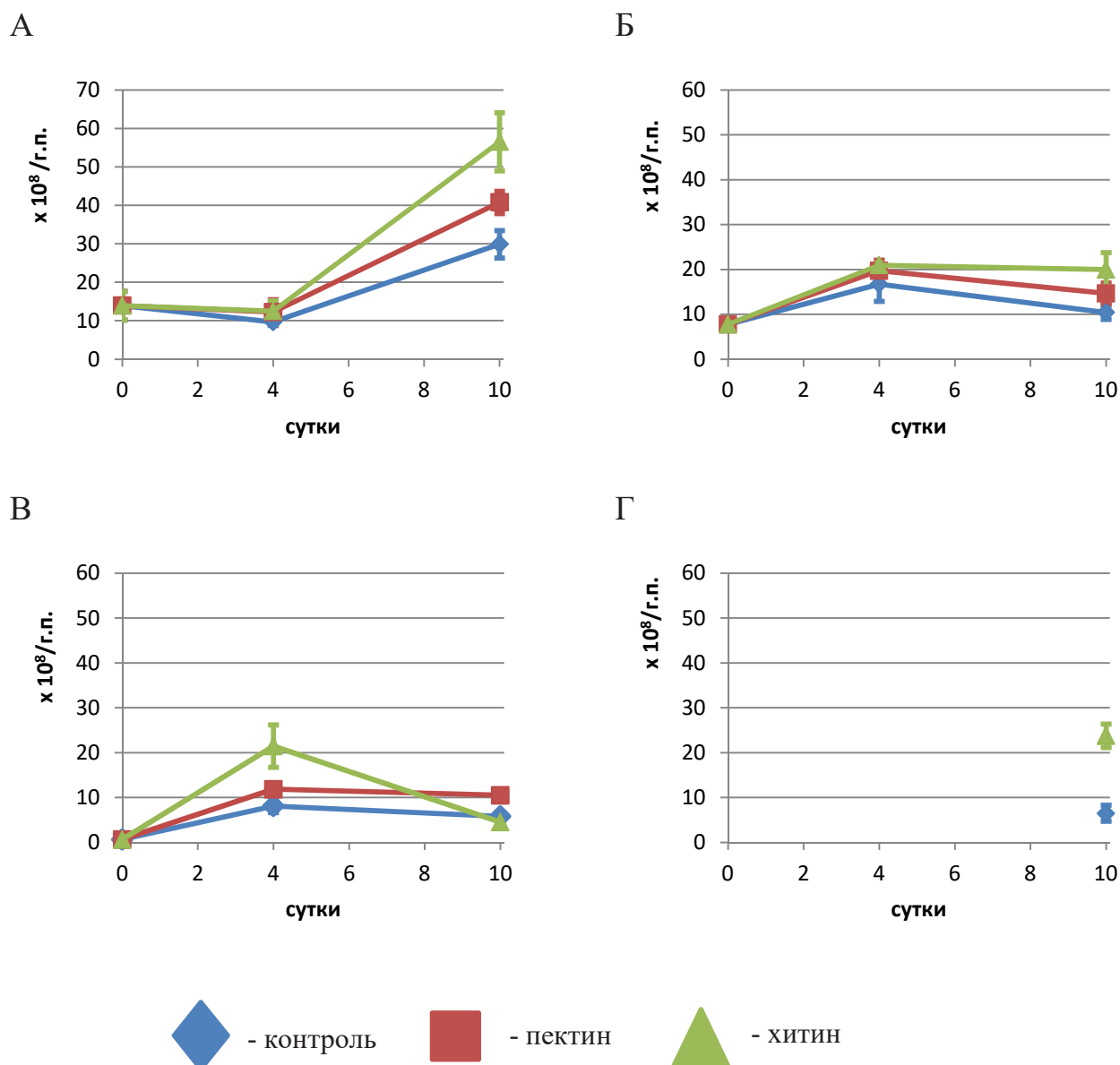


Рис. 9. Динамика численности одноклеточных бактерий в исследуемых образцах: А - современной каштановой почвы; Б - каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В - каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г - многолетнемерзлого грунта. Приведены средние значения (численность/г.п.) в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Во всех образцах гидролитический комплекс одноклеточных бактерий достоверно откликался на внесение полисахаридов (Рис. 9). Численность одноклеточных бактерий возрастала достоверно на хитине (Таблица 4), и была выше, чем на пектине. В образцах многолетнемерзлых грунтов численность одноклеточных бактерий достоверно возрастала при внесении хитина и была сопоставима с численностью в почвах.

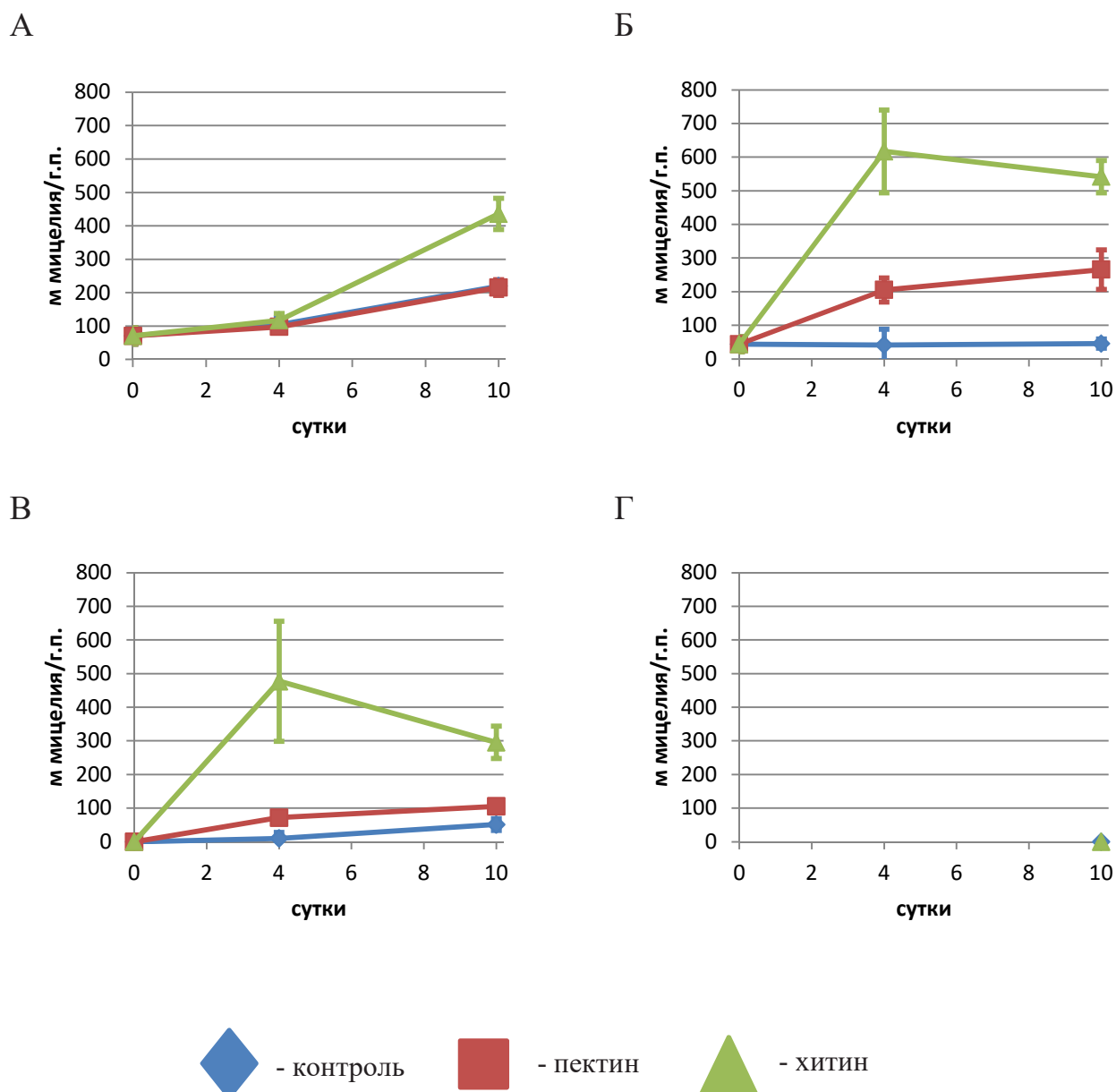


Рис. 10. Динамика численности мицелиальных прокариот в исследуемых образцах: А - современной каштановой почвы; Б - каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В - каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г - многолетнемерзлого грунта. Приведены средние значения (м мицелия/ г.п.) в каждой точке эксперимента, засечки представляют стандартное отклонение.

Численность актиномицетов на исследуемых почвах при внесении субстратов существенно возросла (на пектине в 4-8 раз, на хитине до 50 раз) (Рис. 10 и Таблица 4). Длина актиномицетного мицелия достигла 600 м в почве, погребенной 3500 л.н. на хитине. Длина актиномицетного мицелия в погребенных почвах при внесении субстрата превышала таковую в современных почвах. В

образцах многолетнемерзлых грунтов актиномицетный мицелий не был обнаружен.

Если рассматривать вклад различных групп микроорганизмов в процессы разложения хитина и пектина, можно заметить, что наивысшей гидролитической активностью как в случае с пектином, так и с хитином, обладают актиномицеты, причем вклад хитинолитического актиномицетного комплекса выше, чем пектинолитического. Коэффициент микробного отклика на внесение пектина у одноклеточных прокариот не различается существенно между образцами, а на внесение хитина сильнее реагирует одноклеточный прокариотный хитинолитический комплекс почвы, погребенной 4500 л.н.. Доминирование мицелиальной прокариотной биомассы отличает современные почвы от погребенных. В многолетнемерзлых грунтах гидролиз осуществляется одноклеточными прокариотами.

		Однокл. прокариоты			Миц. прокариоты			Миц. эукариоты
	субстрат	Кон.	Пект.	Хит.	Кон.	Пект.	Хит.	Кон.
современная почва	биомасса, мг/г.п., среднее SD	0,060 ±0,007	0,082 ±0,006	0,113 ±0,015	0,009 ±0,001	0,008 ±0,001	0,017 ±0,002	1,806 ±0,025
	%	100	137	188	100	88	189	100
	p	-	0,026	0,014	-	НД	0,002	-
почва, погребенная 3500 л.н.	биомасса, мг/г.п., среднее SD	0,021 ±0,003	0,029 ±0,005	0,040 ±0,008	0,002 ±0,001	0,010 ±0,002	0,023 ±0,005	0,120 ±0,064
	%	100	138	190	100	500	1150	100
	p	-	НД	НД	-	0,030	0,018	-
почва, погребенная 4500 л.н.	биомасса, мг/г.п., среднее SD	0,012 ±0,002	0,021 ±0,005	0,044 ±0,007	0,002 ±0,001	0,004 ±0,001	0,021 ±0,002	0,007 ±0,012
	%	100	175	366	100	200	1050	100
	p	-	НД	0,013	-	0,045	0,005	-
Многолетне-мерзлый грунт	биомасса, мг/г.п., среднее SD	0,013 ±0,004	0,000 ±0,000	0,048 ±0,005	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000
	%	100	-	369	-	-	-	-
	p	-	-	0,002	-	-	-	-

Таблица 4. Абсолютные значения биомасс групп микроорганизмов в исследуемых образцах и их относительные значения при увлажнении и внесении субстратов на 10 сутки эксперимента. Статистический анализ достоверности различий между образцами с субстратом и увлажненными образцами проводился с помощью парного t-критерия Стьюдента ($N=5$). В таблице приведены значения P_{st} , статистически достоверными признаются различия, при которых $P_{st} < 0,05$. НД – недостоверные различия.

5.3. Метаболически активный микробный комплекс исследуемых почв и грунтов

5.3.1. Исследование отклика активного микробного комплекса исследуемых почв и грунтов на внесение полисахаридов

Прокариотное микробное сообщество рассматриваемых почв исследовали с помощью метода *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH - fluorescent *in situ* hybridization). Метод FISH широко используется для изучения микробных сообществ в морских и пресноводных экосистемах, активированном иле и биореакторах, торфах и ризосфере растений, а также множестве других природных и антропогенных сред (Панкратов, Белова, Дедыш, 2005; Manz et al., 1996; Neef et al., 1998; Rabus et al., 1999). Преимущество этого метода состоит в том, что на основе идентификации микроорганизмов по последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК, удается исследовать микробное разнообразие непосредственно *in situ*, минуя стадии высевов на питательные среды или обогащение.

Рассматривая абсолютную численность метаболически активных одноклеточных организмов во всех типах исследованных почв, следует отметить, что их численность в современной почве намного превышала таковую в погребенных (Рис. 11). Однако, доля клеток, определяемых как метаболически активные, во всех почвах без внесения субстрата сравнима. Активный пул микроорганизмов минимален в многолетнемерзлых грунтах. Значительная доля микроорганизмов находится в форме покоящихся или метаболически неактивных клеток.

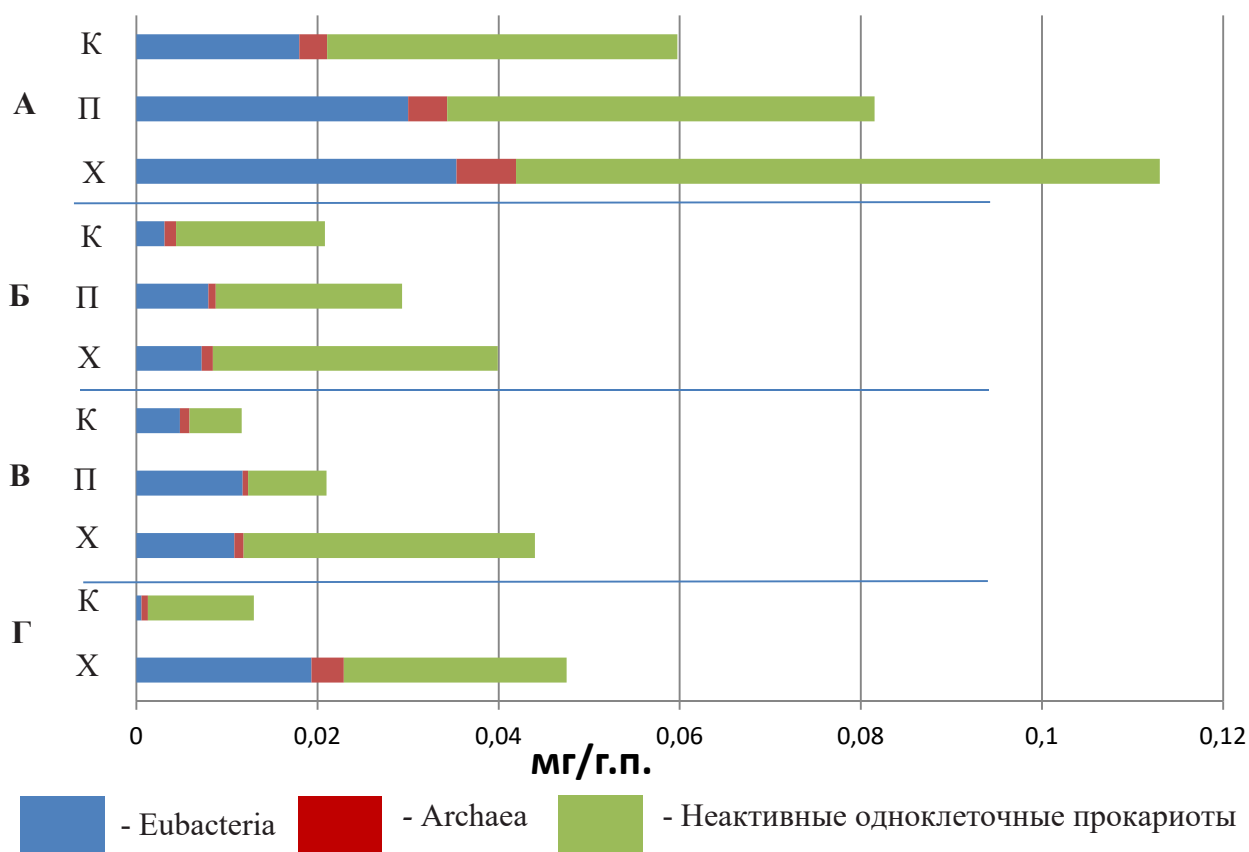


Рис. 11. Биомасса активных одноклеточных прокариот при увлажнении и внесении субстрата, определенная методом FISH (на 10 сут. эксперимента) в образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта.

В целом, биомасса представителей домена *Bacteria* во всех рассматриваемых вариантах варьировала в пределах от 0 до 0,035 мг/г.п. (Таблица 5). Во всех исследованных образцах число клеток представителей домена *Bacteria* при добавлении полисахаридов возрастало. Биомасса представителей домена *Archaea*, гибридизованных с зондами ARCH915 и ARC344, была на порядок ниже и варьировала от 0 до 0,007 мг/г.п. При внесении субстрата активная биомасса одноклеточных прокариот возрастает в образцах многолетнемерзлых грунтов (Таблица 5).

Индекс отношения биомасс активных представителей домена *Archaea* к *Bacteria* варьировал между образцами и составлял от 0,05 до 1,3 (Рис.12). Метаболически активный одноклеточный прокариотный комплекс во всех почвенных образцах характеризовался абсолютным преобладанием представителей

домена Bacteria. В образцах многолетнемерзлых грунтов преобладали Archaea, однако при внесении субстрата тенденция не сохранилась.

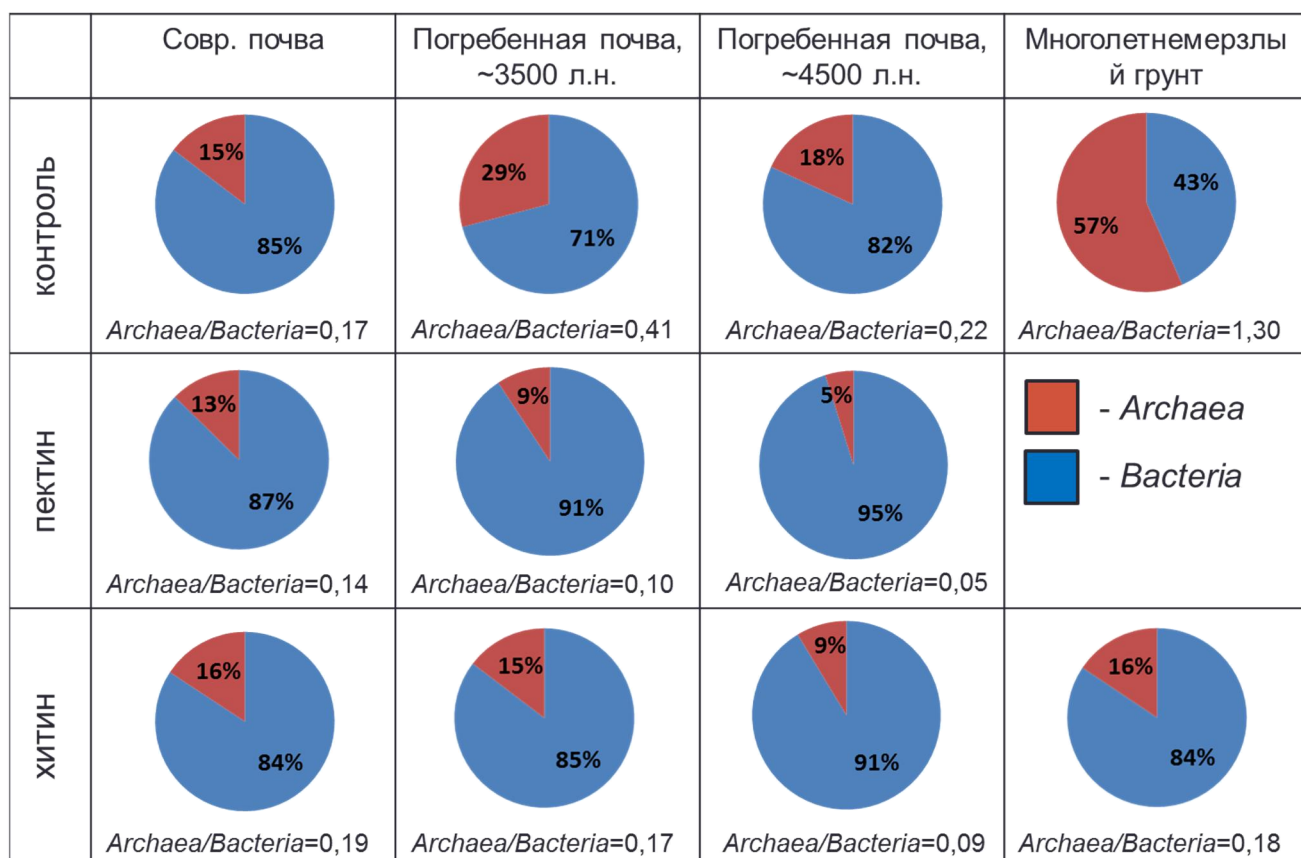


Рис. 12. Соотношение биомасс метаболически активных Archaea и Bacteria

Биомасса метаболически активных прокариот, в которую входят значения биомассы одноклеточных прокариот, определяемой методом FISH и значения биомассы проросшего актиномицетного мицелия, максимальна в современных каштановых почвах (Рис. 12) Однако, в погребенных почвах при внесении субстрата биомасса возрастает более интенсивно, чем в современных, в ряду контроль-пектин-хитин увеличивается роль актиномицетного компонента.

		Общая биомасса однокл. прокариот			Eubacteria			Archaea		
	Субстр.	Конт.	Пект.	Хит.	Конт.	Пект.	Хит.	Конт.	Пект.	Хит.
совр. почва	Биом., мг/г.п. сред. SD	0,060 ±0,007	0,082 ±0,006	0,113 ±0,015	0,018 ±0,005	0,030 ±0,003	0,035 ±0,005	0,003 ±0,001	0,004 ±0,001	0,007 ±0,001
	%	100	137	188	100	167	194	100	133	233
	p	-	0.026	0.014	-	НД	НД	-	0,002	0,001
почва, погребен. 3500 л.н.	Биом., мг/г.п. сред. SD	0,021 ±0,003	0,029 ±0,005	0,040 ±0,008	0,003 ±0,001	0,008 ±0,001	0,007 ±0,001	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000
	%	100	138	190	100	267	233	100	100	100
	p	-	НД	НД	-	НД	НД	-	НД	НД
почва, погребен. 4500 л.н.	Биом., мг/г.п. сред. SD	0,012 ±0,002	0,021 ±0,005	0,044 ±0,007	0,005 ±0,001	0,012 ±0,003	0,012 ±0,002	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000
	%	100	175	366	100	150	150	100	100	100
	p	-	НД	0.013	-	НД	НД	-	НД	НД
Многолет немерзлы й грунт	Биом., мг/г.п. сред. SD	0,013 ±0,004	0,000 ±0,000	0,048 ±0,005	0,000 ±0,000	-	0,019 ±0,005	0,001 ±0,000	-	0,004 ±0,001
	%	100	-	369	100	-	380	100	-	400
	p	-	-	0.002	-	-	0,02	-	-	0,02

Таблица 5. Абсолютные значения общей биомассы одноклеточных прокариот и активной биомассы, представленной доменами Eubacteria и Archaea в исследуемых образцах и их относительные при увлажнении и внесении субстратов. Статистический анализ достоверности различий между образцами с субстратом и увлажненными образцами проводился с помощью парного t-критерия Стьюдента (N=3). В таблице приведены значения P_{st} , статистически достоверными признаются различия, при которых $P_{st} < 0,05$. НД – недостоверные различия

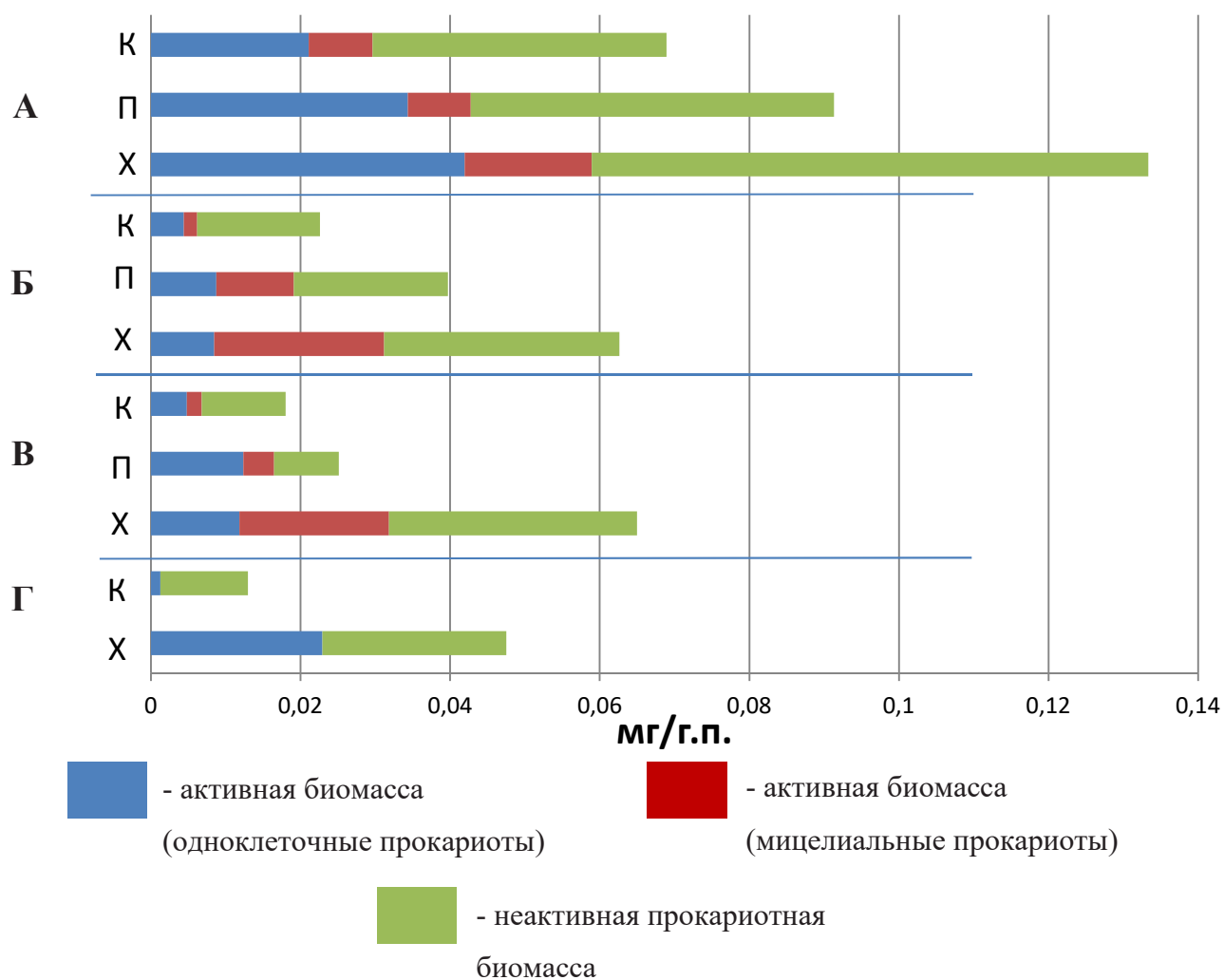


Рис. 13. Значения активной биомассы одноклеточных и мицелиальных прокариот при увлажнении и при внесении субстрата (на 10 сут. эксперимента) в образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что доля метаболически активных одноклеточных микроорганизмов возрастает в ряду контроль-хитин-пектин (Рис. 13). По-видимому, это связано с разной степенью доступности субстрата для микроорганизмов. Наибольшая доля мицелиальных прокариот обнаруживается на хитине, так как хитин является лучшим субстратом для культивации актиномицетов.

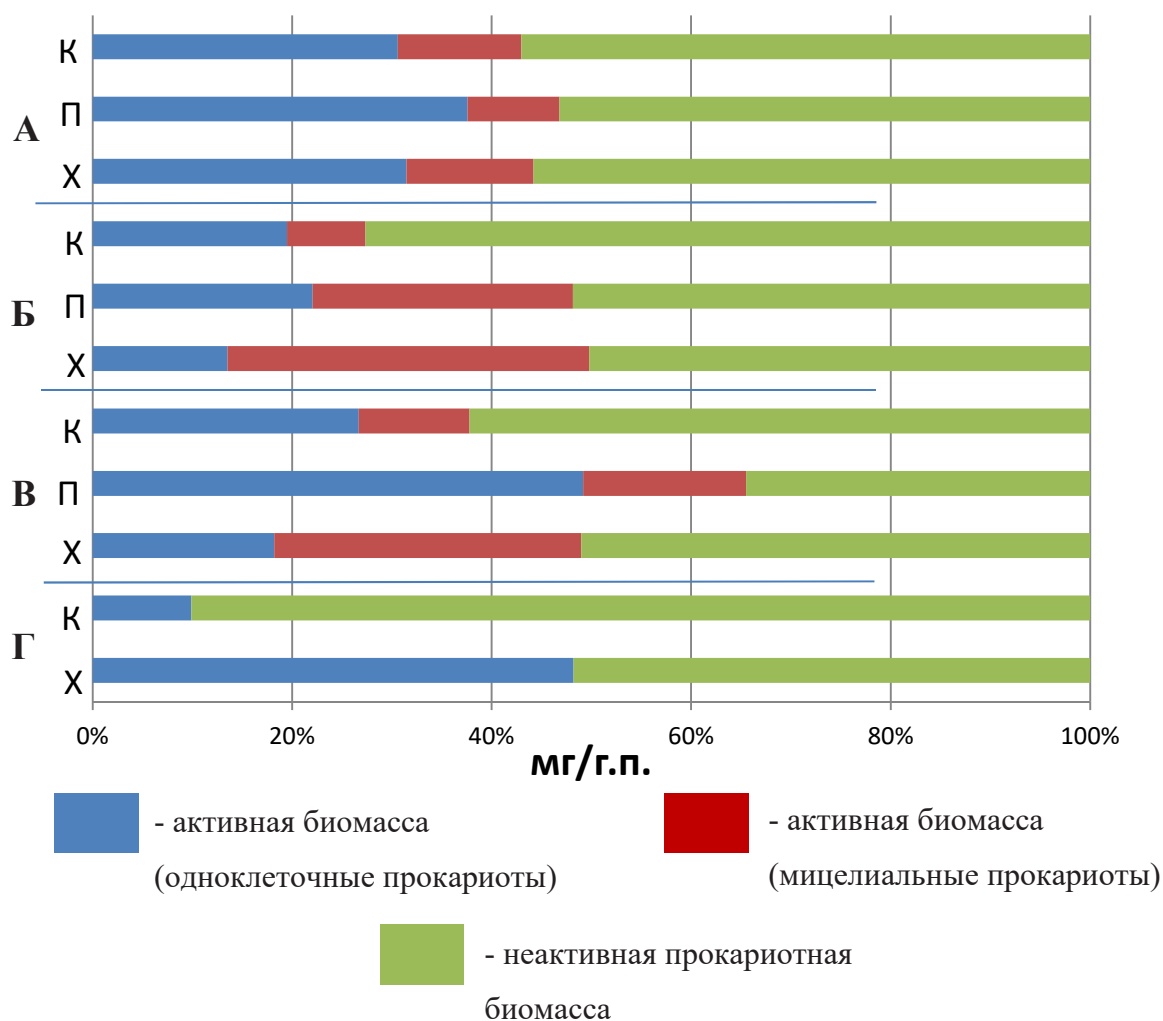


Рис. 14. Доля активной биомассы одноклеточных и мицелиальных прокариот при увлажнении и при внесении субстрата (на 10 сут. эксперимента) в образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта.

Доля активных микроорганизмов в обоих образцах погребенной почвы возрастает активнее, чем в современной (Рис. 14). Можно предположить, что это связано с более суровыми условиями существования организмов. Неблагоприятные условия существования обуславливают существование микробного сообщества, готового отреагировать резким повышением биомассы при малейшем изменении внешних условий в благоприятную сторону. Если сравнить образцы между собой, следует заметить, что доля метаболически активных организмов в образцах возрастает по мере увеличения возраста образца и глубины его залегания. Наиболее активно на внесение субстрата реагируют микробные сообщества погребенных многолетнемерзлых грунтов.

Предыдущая работа лаборатории в области исследования микробных сообществ различных почв методом FISH показала, что в современных каштановых почвах доля метаболически активных микроорганизмов как в контрольных, так и в образцах с полисахаридом обычно не превышает 30-40% от общей биомассы и не возрастает существенно при внесении субстрата. Полученные данные свидетельствуют об увеличении количества метаболически активных микроорганизмов до 2 раз при внесении субстрата в погребенных почвах и до 6 раз в погребенных многолетнемерзлых грунтах, что подтверждает гипотезу о большей потенциальной гидролитической активности погребенных почв и грунтов по сравнению с непогребенными.

5.3.2. Идентификация отдельных филогенетических групп активного микробного комплекса и оценка их биомассы

Для идентификации и оценки численности филогенетических групп эубактерий, входящих в гидролитические комплексы исследуемых почв, нами был применен набор из группо-специфичных олигонуклеотидных зондов, наиболее широко применяемых в практике современных молекулярно-экологических исследований. Предполагаемый спектр детекции этих зондов охватывает представителей нескольких филогенетических ветвей домена *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Veruccomicrobia*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* и *Firmicutes*. Используемые в настоящей работе зонды включали четыре из пяти известных классов ветви *Proteobacteria* – *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*.

Бактериальный комплекс современных почв достаточно разнообразен и характеризуется доминированием филумов *Bacterioidetes* (биомасса до 0,0015 мг/г.п. в контрольных образцах) и *Proteobacteria* (биомасса до 0,0037 мг/г.п. в контрольных образцах) (Рис. 15, Рис. 16, А). На внесение пектина активно реагировали представители филумов *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* и класс *Betaproteobacteria*, на внесение хитина – представители филума *Firmicutes*, классы *Alphaproteobacteria* и *Betaproteoacteria* филума *Proteobacteria*, представители *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Veruccomicrobia*.

Увеличение численности представителей *Verucomicrobia* в вариантах с хитином говорит об их возможном участии в процессах деструкции.

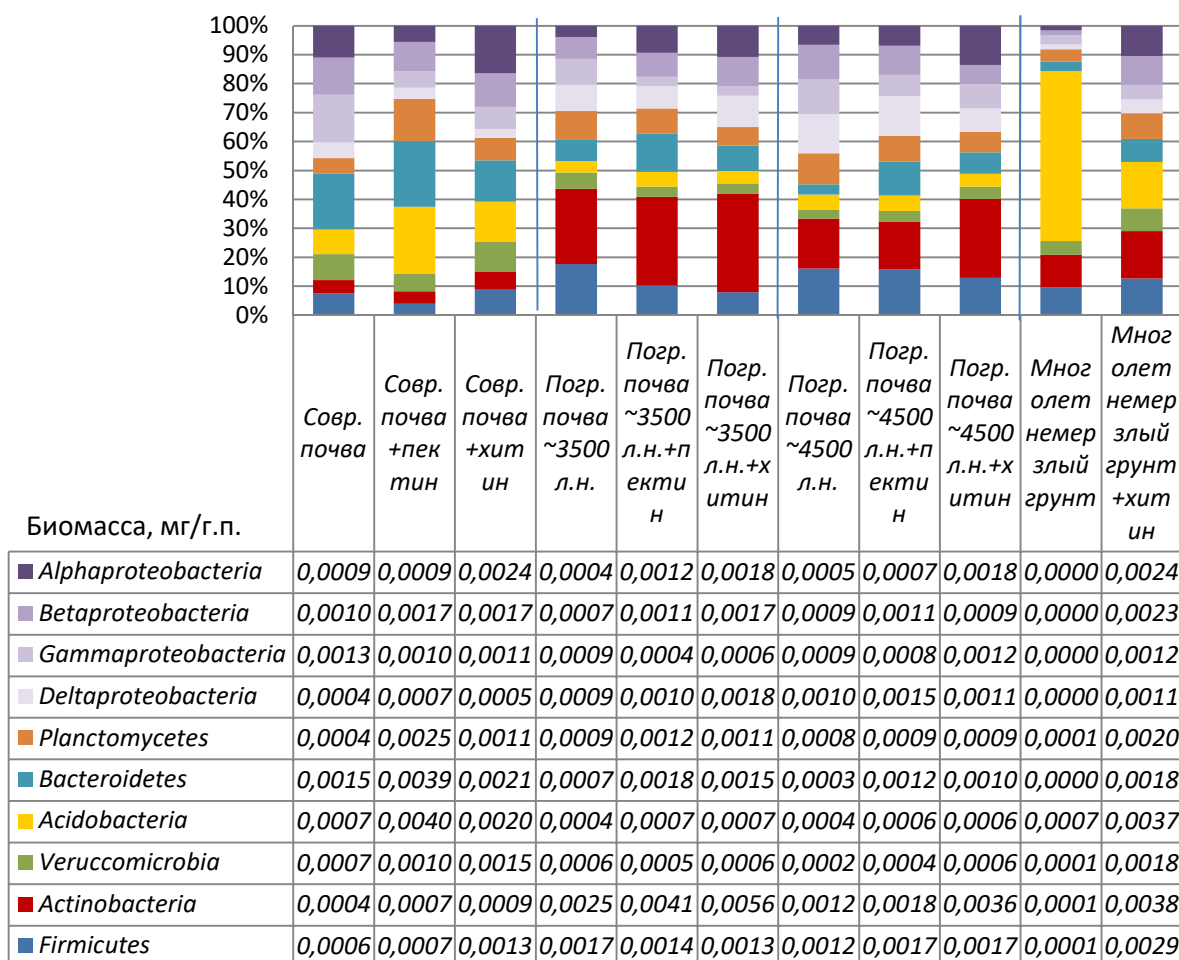


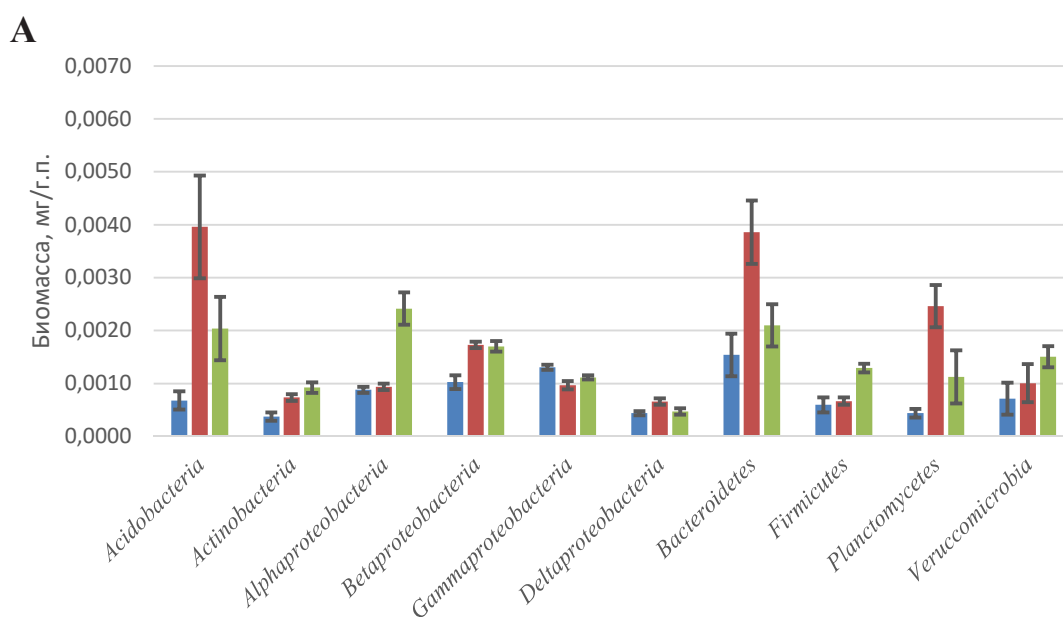
Рис. 15. Относительные значения биомассы филогенетических групп домена Bacteria при увлажнении и при внесении субстрата (на 10 сут. эксперимента) в образцах (метод FISH)

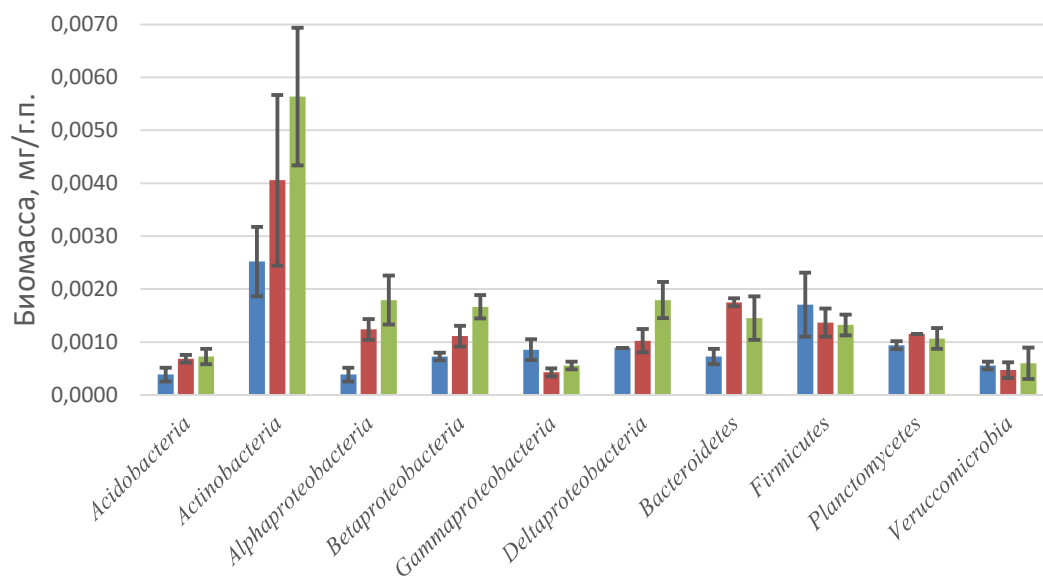
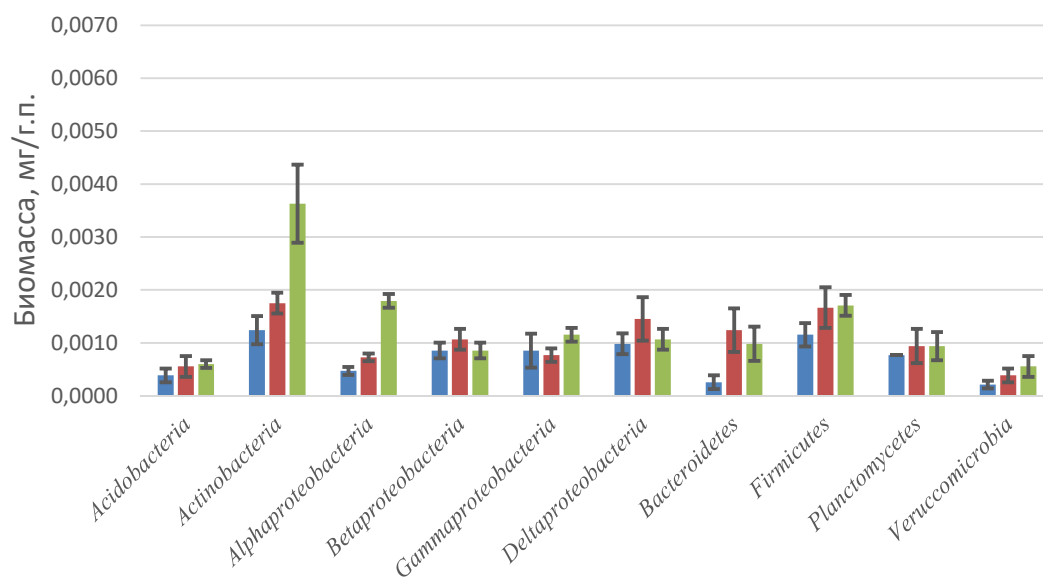
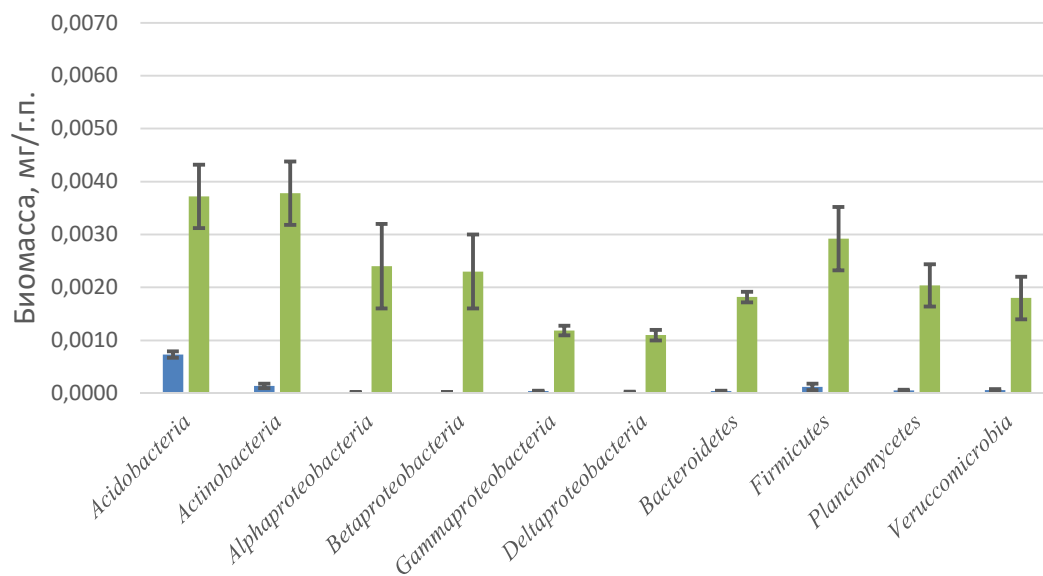
На данный момент среди описанных и узаконенных представителей *Verrucomicrobia* выявлены бактерии, способные к росту на целлюлозе, пектине, крахмале (Chin, Liesack, Janssen, 2001; Sangwan et al., 2004).

В целом бактериальный одноклеточный комплекс современных почв характеризуется более равномерным откликом всех филумов домена на внесение субстрата.

Наибольшей численностью в образцах почв, погребенных 3500 л.н. характеризовались представители *Actinobacteria* (биомасса до 0,0025 мг/г.п. в контрольных образцах), *Proteobacteria* (биомасса до 0,0028 мг/г.п. в контрольных образцах) и *Firmicutes* (биомасса до 0,0017 мг/г.п. в контрольных образцах) (Рис.

15, Рис. 16, Б). При внесении пектина возрастала биомасса *Actinobacteria*, представителей классов *Alphaproteobacteria* и *Betaproteobacteria* филума *Proteobacteria* и филума *Bacteroidetes* (Рис. 16, Б). Эти группы организмов наиболее часто упоминаются в числе основных агентов деструкции органического вещества в природных экосистемах (Pourcher et al., 2001). Численность представителей *Bacteroidetes* достоверно возрастала при внесении всех субстратов, максимально при внесении пектина. Представители группы *Bacteroidetes* в природных экосистемах играют роль в превращении органического вещества, участвуя в деструкции нерастворимых полимерных соединений углерода – целлюлозы и хитина (Kirchman, 2002; Manz et al., 1996; O’Sullivan, Weightman, Fry, 2002). Численность представителей филума *Actinobacteria* значимо возрастало на хитине наряду с численностью представителей классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*. В образцах почв, погребенных 4500 л.н. наблюдаются схожие тенденции (Рис. 16, В).



Б**В****Г**

- контроль



- пектин



- хитин

Рис. 16. Биомасса филогенетических групп домена Bacteria при увлажнении и при внесении субстрата (на 10 сут. эксперимента) в образцах в образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта (метод FISH).

Все филогенетические группы микробного сообщества в многолетнемерзлых грунтах очень резко реагируют на внесение субстрата. Доминирующими группами в контроле являются представители *Acidobacteria* (биомасса в контрольных образцах до 0,007 мг/г.п.) (Рис. 16, Г). При внесении субстрата наиболее сильно биомасса всех филумов вырастает на два порядка, с доминированием *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

Бактерии прочих идентифицированных в сообществах групп, вероятно, имеют другие трофические приоритеты, либо являются К-стратегами, не способными быстро увеличивать численность при использовании относительно легкодоступных субстратов.

Actinobacteria характеризуются наивысшей численностью на хитине и пектине, поэтому стоит рассмотреть эту группу подробнее (Рис. 17). Соотношение мицелиальных и одноклеточных форм в современных почвах мало варьирует, одноклеточные бактерии составляют 4-8% от всей биомассы актинобактерий вне зависимости от внесения субстрата (доля мицелиальных форм 92-98% соответственно). В обоих образцах погребенных почв доля мицелиальных форм также доминирует и возрастает в ряду контроль-пектин-хитин и варьирует от 40% на контроле до 80% на хитине. По абсолютным значениям биомасса *Actinobacteria* в погребенных почвах резко возрастает при внесении полисахарида и достигает в максимальном значении 0,028 мг/ г. п. (образец погребения 3500 л.н., хитин). Актинобактерии в погребенных почвах наращивают биомассу при внесении субстрата гораздо интенсивнее, чем в современных. Это обусловлено длительным нахождением спор мицелиальных актинобактерий в почве, условиями длительного недостатка питания, отсевом штаммов, способных пережить неблагоприятные условия и отреагировать всплеском численности на

любое органическое вещество. В образцах многолетнемерзлых грунтов мицелиальных форм актинобактерий обнаружено не было.

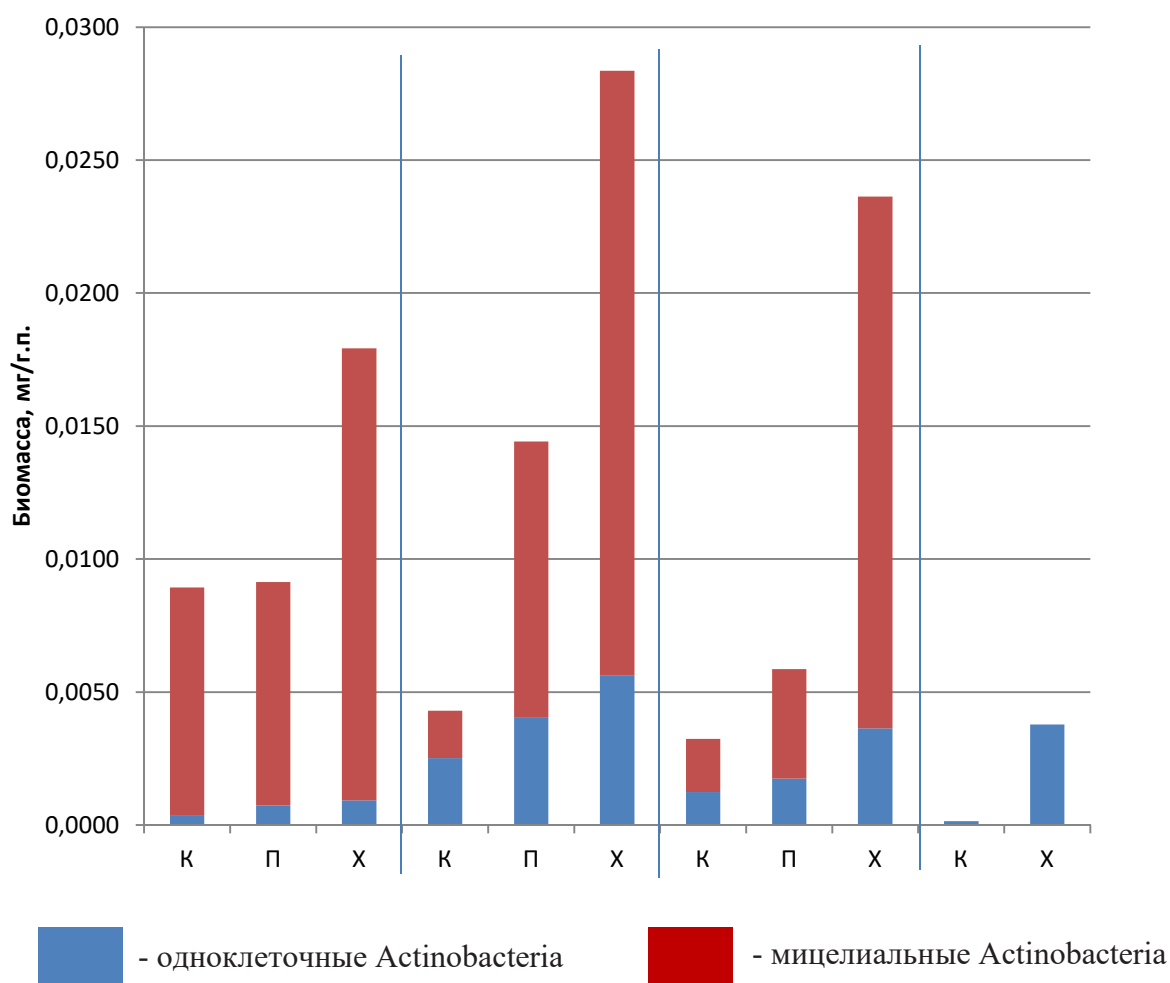
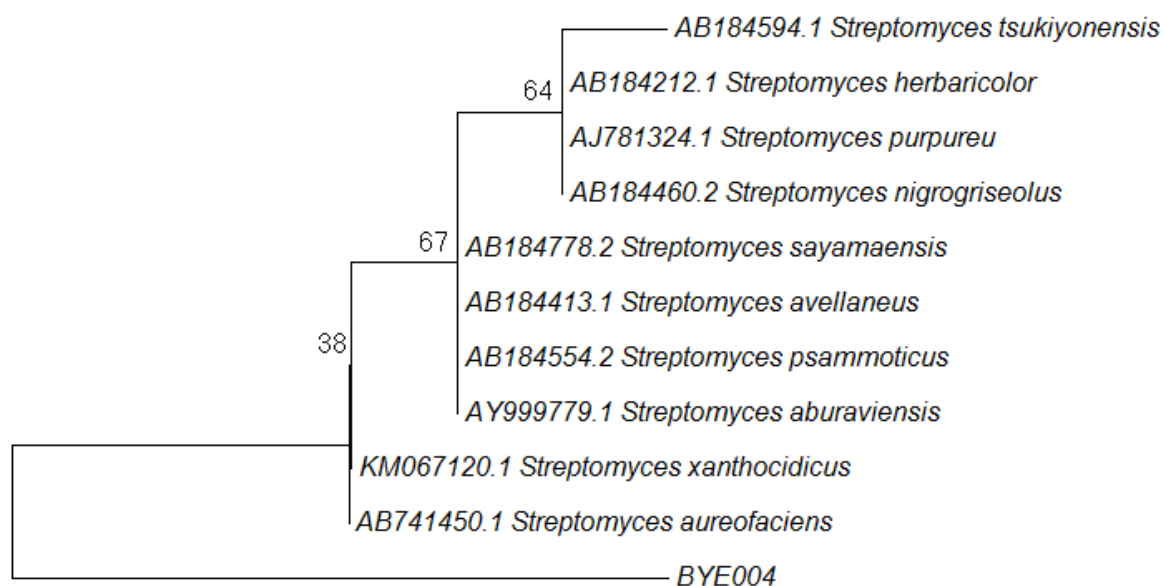


Рис. 17. Соотношение биомасс одноклеточных и мицелиальных представителей Actinobacteria в исследуемых образцах: А - современной каштановой почвы; Б – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; В – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Г – многолетнемерзлого грунта.

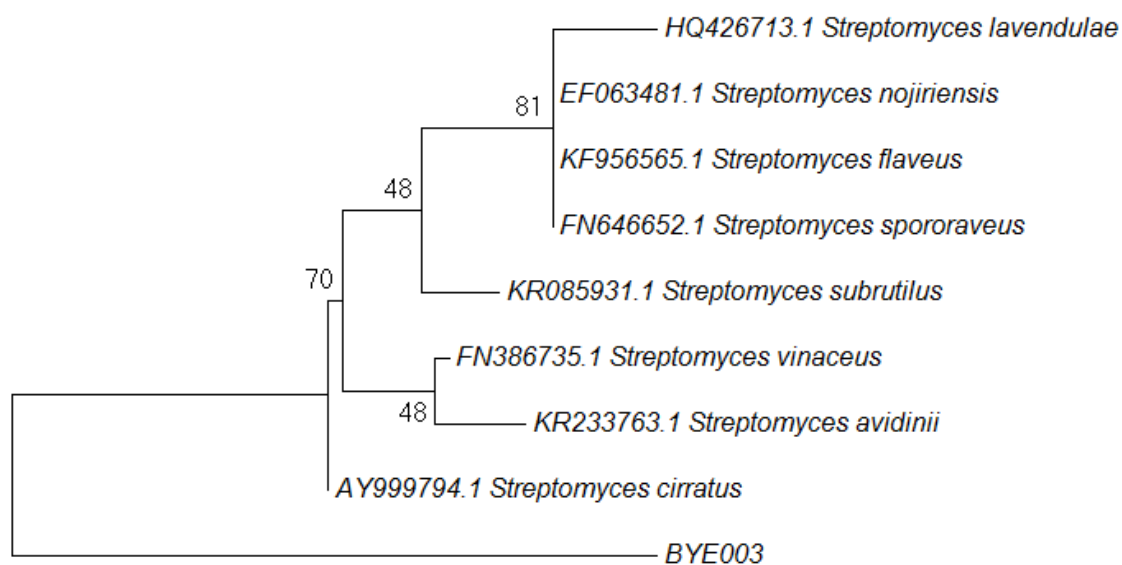
5.4. Выделение и идентификация доминантов гидролитического сообщества исследуемых почв и грунтов

Исследование комплекса хитинолитических и пектинолитических микроорганизмов в каштановых погребенных почвах и погребенных многолетнемерзлых грунтах с использованием метода посева на плотные питательные среды с добавлением хитина или пектина, как единственного источника углерода и азота. Исследования хитинолитического микробного

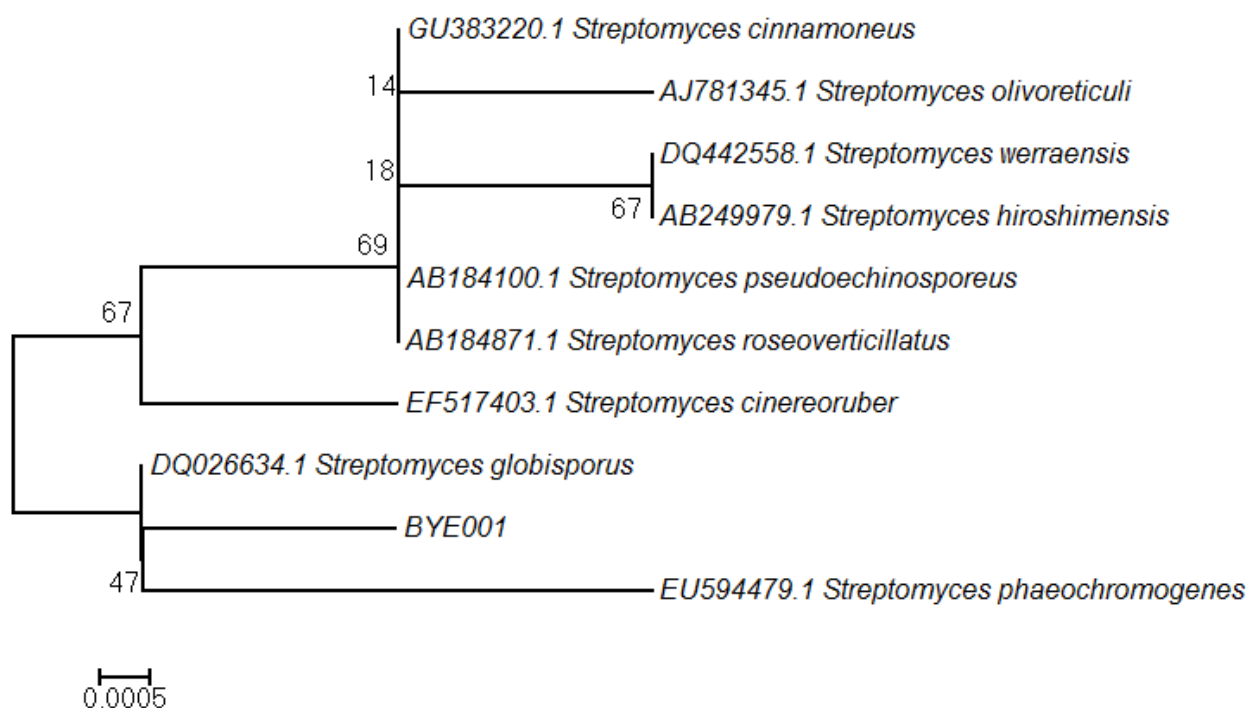
комплекса погребенных каштановой почв показали, что доминантами среди выделяющихся методом посева на плотной среде с хитином мицелиальных прокариот были представители рода *Streptomyces* (Рис. 18).



0.0020



0.0020



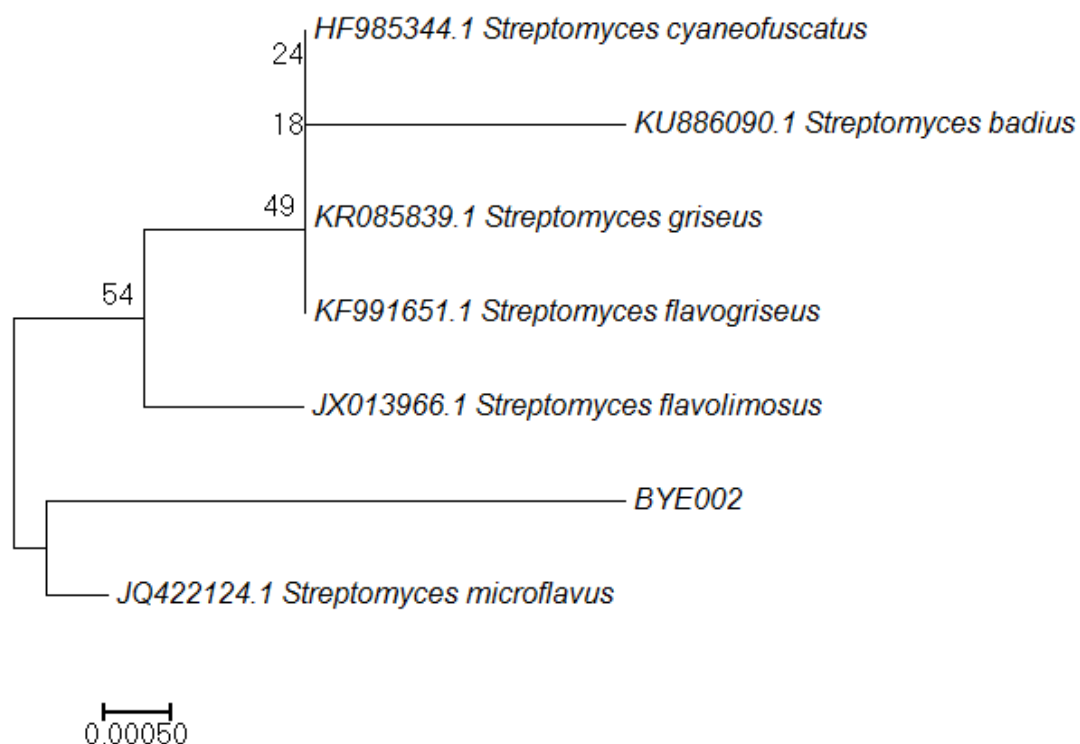


Рис. 18. Филогенетическое положение в штаммов, выделенных из погребенных каштановых почвы на среду с хитином.

Анализ последовательности 16s рНК не дал четкого соответствия выделенного штамма последовательности из базы в двух случаях из четырех, ввиду близкого положения видов в пределах рода *Streptomyces*, поэтому дополнительно был проведен фенотипический анализ выделенных штаммов.

Штамм	Среда	Цвет воздушного мицелия	Цвет субстратного мицелия	Наличие раствори мого пигмента	Наличие меланоидн ого пигмента	Форма спороносцев
BYE003	Гаузе-I	серовато- сиреневый	бесцветный			
	глицерин- нитратная	белый с сиреневым оттенком		Нет		
	Гаузе-II	бесцветный	бесцветный	нет		

	Пептонно- дрожжевой агар с железом	бесцветный			нет	
	Овсяный агар	серовато- сиреневый	бесцветный			плотные неправильные спирали спор
Идентифицирован как <i>Streptomyces cirratus</i>						
ВУЕ001	Гаузе-I	розовато- белый	коричневый	фиолетов ый	нет	
	глицерин- нитратная	розовато- белый	коричневый	фиолетов ый	нет	
	Гаузе-II	бледный белый	коричневый	черный	нет	
	пептонно- дрожжевой агар с железом				интенсивн ый	
	Овсяный агар	белый	коричневый			прямые цепочки спор
Идентифицирован как <i>Streptomyces phaeochromogenes</i>						
ВУЕ005	Гаузе-I	серый	желтовато- коричневый		нет	
	глицерин- нитратная	белый	желтовато- коричневый		нет	
	Гаузе-II	белый	желтовато- коричневый		нет	
	пептонно- дрожжевой агар с железом	белый	желтовато- коричневый		нет	
	Овсяный агар	серый	зеленовато- желтый			прямые цепочки спор
Идентифицирован как <i>Streptomyces flavogriseus</i>						
ВУЕ004	Гаузе-I	серый	желто-бурый		нет	
	глицерин- нитратная	серый	желто-бурый		нет	
	Гаузе-II	белый	бесцветный		нет	
	пептонно- дрожжевой агар с железом	серый	желто-бурый		нет	

	Овсяный агар	серый	зеленовато- желтый		нет	прямые цепочки спор
Идентифицирован как <i>Streptomyces aureofaciens</i>						

Таблица 6. Фенотипическая идентификация выделенных штаммов актиномицетов.

Среди немицелиальных бактерий одноклеточные представители филума *Actinobacteria* (род *Microbacterium*) и *Proteobacteria* (род *Sphingobium*) (Таблица 6) оказались наиболее многочисленными. Из литературы известна гидролитическая способность представителей как протеобактерий, так и коринеподобных актинобактерий (Лысак и др., 2010). При выделении доминантов на среду с пектином, наиболее многочисленными оказались представители тех же таксономических групп. Из образцов многолетнемерзлых грунтов удалось выделить один активный бактериальный штамм, обладающий выраженной хитинолитической способностью, который был определен как *Brevibacillus brevis* (Таблица 7). Выделенный штамм обладал выраженной антибиотической активностью – вокруг колоний образовывались зоны лизиса.

Тип образца	Доминирующие микроорганизмов-гидролитиков	виды
Погребенные каштановые почвы	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces cirratus</i> <i>Streptomyces flavogriseus</i> <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> <i>Streptomyces microflavus</i> <i>Microbacterium testaceum</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Sphingobium sp.</i>	
Погребенные многолетнемерзлые грунты	<i>Brevibacillus brevis</i>	

Таблица 7. Список доминирующих видов микроорганизмов-гидролитиков, выделенных на среды с хитином или пектином.

5.5. Метагеномный анализ прокариотных микробных сообществ исследуемых почв и грунтов (таксономическая структура сообщества)

После проверки качества секвенирования, формирования ОТЕ и удаления синглтонов получено 53794 сиквенса, которые использовались для дальнейшего анализа. Из них на каждый образец приходится от 1884 до 11626 сиквенсов, в среднем примерно 6724 нуклеотидных последовательностей на образец. Длина сиквенсов после обработки (удаления олигонуклеотидных идентификаторов и служебных последовательностей) варьировала в примерных пределах от 400 до 932 нуклеотидных оснований, в среднем составляя около 461 нуклеотидных оснований.

Прокариотное сообщество современных каштановых почв представлено преимущественно представителями филумов *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Verucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes* и *Planctomycetes* (Рис. 19). Наибольшую долю занимают филумы *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Филумы *Proteobacteria* и *Firmicutes* часто занимают доминирующее положение в почвенных сообществах, доминирование *Actinobacteria* скорее всего связано с засушливостью климата на исследуемой территории. Известно, что многие актинобактерии, в особенности их мицелиальные представители – актиномицеты – приспособлены к местообитаниям с низкой влажностью (Звягинцев, Зенова, 2001; Зенова, Звягинцев, Судницын, 2014; Ярославцев, 2010). По-видимому, это дает им преимущество в почвах сухого климата. Высокое содержание представителей филума *Gemmatimonadetes*, обычно составляющих не более 2% от почвенного сообщества, по-видимому также связано с засушливым климатом, к которому тяготеет данная группа (DeBruyn et al., 2011). Высокое содержание филума *Verucomicrobia* подтверждает предположения исследователей о неучтенном потенциале данной группы из-за несовершенства праймерных систем (Bergmann et al., 2011). При внесении хитина в образцы современных почв абсолютными доминантами становятся филумы *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, доля минорных филумов становится менее выраженной.

Прокариотное сообщество каштановых почв, погребенных около 3500 л.н. представлено преимущественно представителями филумов *Firmicutes*,

Actinobacteria, *Proteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Chloroflexi*. При внесении субстрата наблюдается та же тенденция, что и в современных почвах - в доминанты выходят представители *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Значительную долю сообщества (более 1,5%) в погребенных почвах составляли представители метаногенных архей из филума *Euryarchaeota* домена Archaea, не достигая значений более процента в остальных образцах. Крайне скудная представленность данного филума в исследуемых почвах объясняется тем, что метаногены – облигатные анаэробы и обычно встречаются в переувлажненных почвах с восстановительными условиями. Однако существуют работы, в которых показана распространенность эвриархеот в разных, в том числе и сухих почвах (Angel, Claus, Conrad, 2012). Вероятно, эвриархеоты присутствуют в сухих почвах в настолько небольших количествах, что при анализе тотальной ДНК «затеняются» обилием генов других прокариот.

Прокариотное сообщество каштановых почв, погребенных около 4500 л.н. представлено филумами *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Chloroflexi*. Увеличение доли филума *Gemmatimonadetes* по мере увеличения глубины залегания образцов, по-видимому, отражает все меньшую доступность влаги для клеток прокариот. При внесении хитина доминирующим становится филум *Actinobacteria*, представители которого обладают выраженной гидролитической активностью.

В образцах многолетнемерзлых грунтов представители *Proteobacteria* составляют абсолютное большинство от всех проанализированных последовательностей (>70%). При внесении субстрата филумы *Proteobacteria* и *Firmicutes* становятся абсолютными доминантами. Доминирование данных филумов характерно для многолетнемерзлых грунтов и подтверждается предыдущими исследованиями многолетнемерзлых местообитаний Арктики (Steven et al., 2007) и Антарктиды (Gilichinsky et al., 2007).

Таким образом, данные, полученные методом высокопроизводительного секвенирования, коррелируют с данными полученными ранее методом FISH (Manucharova et al., 2014). Основными филумами, осуществляющими разложение

хитина в современных почвах являлись *Firmicutes*, в погребенных почвах *Actinobacteria*, в многолетнемерзлых грунтах *Proteobacteria*. Во всех исследуемых образцах домен Archaea был минорным и составлял не более 1,5% от всех последовательностей.

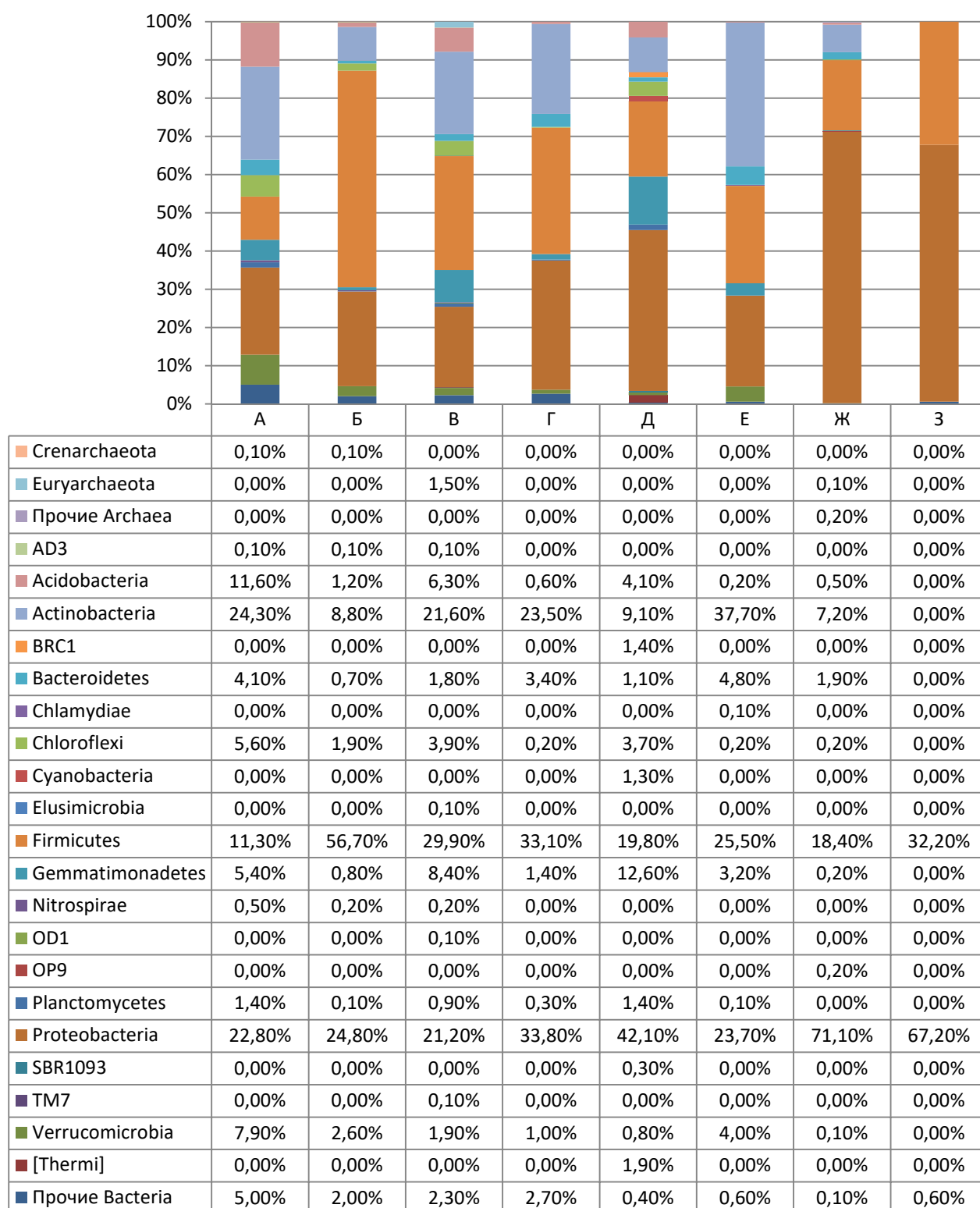


Рис. 19. Долевое распределение филумов доменов Archaea и Bacteria в исследуемых образцах: А - современной каштановой почвы; Б - современной каштановой почвы, инкубированной с хитином; В – каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н.; Г - каштановой почвы, погребенной ~3500 л.н., инкубированной с хитином; Д – каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н.; Е - каштановой почвы, погребенной ~4500 л.н., инкубированной с хитином; Ж – многолетнемерзлого грунта; З - многолетнемерзлого грунта, инкубированного с хитином.

Анализ альфа-разнообразия (Таблица 8) показал, что самый простой показатель - видовое богатство – закономерно уменьшается по мере увеличения возраста погребения в ряду современная почва – почва, погребенная 3500 л.н. – почва, погребенная 4500 л.н. – многолетнемерзлый грунт. Во многих работах по метагеномике встречаются выводы о том, что биоразнообразие прокариотных сообществ определяется в первую очередь такими показателями, как рН среды и содержание углерода (Чернов, 2016). В данной работе возраст и глубина залегания образца коррелируют с содержанием органического вещества, что связано с истощением запасов органических веществ с течением времени и отсутствием притока с поверхности. При внесении субстрата альфа-разнообразие уменьшается за счет выхода определенных родов (видов) в доминанты. Анализ альфа-разнообразия прокариотного сообщества с учетом выровненности обилий таксонов (индекс Шеннона), с учетом предполагаемого реального разнообразия ОТЕ в сообществе (индекс Chao1) и с учетом филогении (индекс PD) показал ту же тенденцию.

	Современная почва		Почва, погребенная 3500 л.н.		Почва, погребенная 4500 л.н.		Многолетнемерзлый грунт	
	Конт.	Хит.	Конт.	Хит.	Конт.	Хит.	Конт.	Хит.
Индекс Шеннона	9,5	6,9	8,5	7,8	7,9	6,3	6,0	5,1
Индекс Chao1	1755	841	1251	1085	808	751	234	126
Видовое богатство	959	454	715	550	514	336	214	121

Филогенетическое разнообразие	54,9	28,2	43,5	30,4	30,2	19,5	15,7	6,1
-------------------------------	------	------	------	------	------	------	------	-----

Таблица 8. Микробиологические характеристики исследуемых образцов при увлажнении и внесении субстрата

Поскольку ранее была выявлена тенденция к увеличению потенциальной активности микробного сообщества при увеличении возраста и глубины погребения образца, анализ бета-разнообразия должен был ответить на вопрос: различаются ли доминанты гидролитического сообщества между образцами.

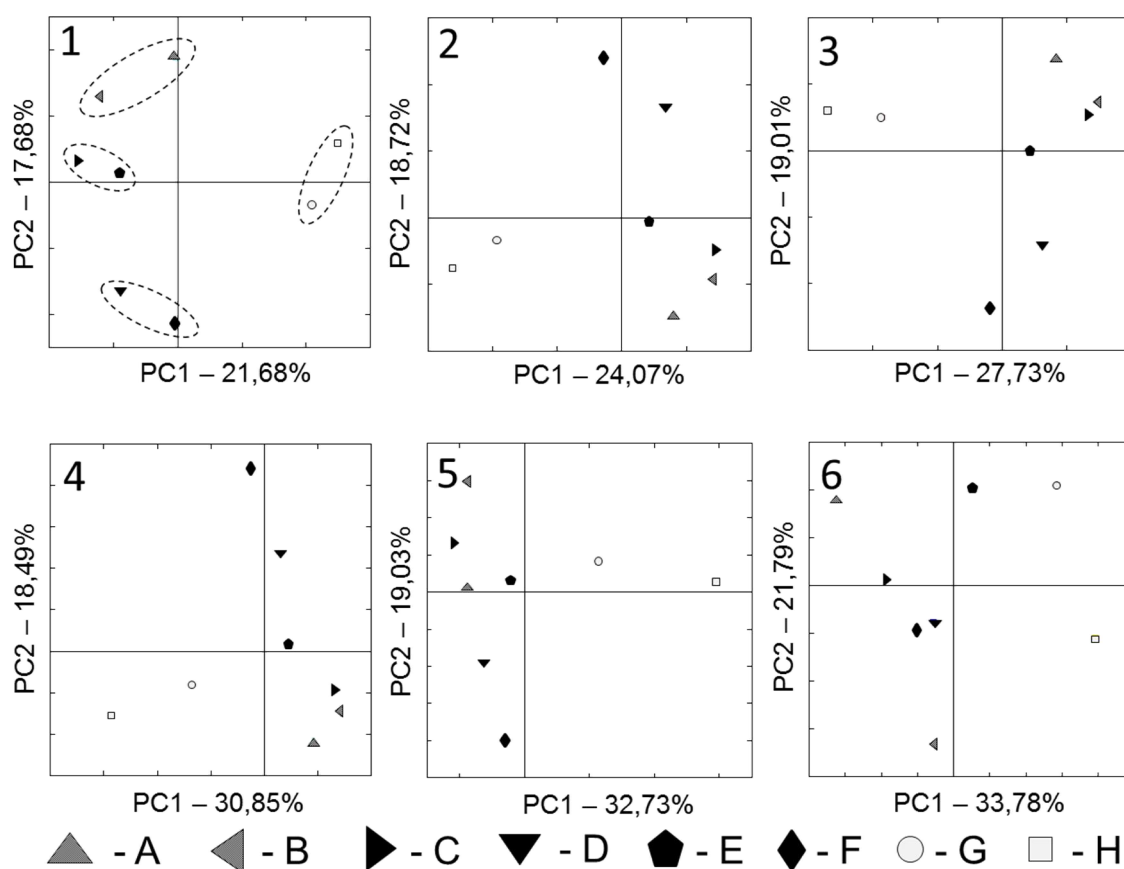


Рис. 20. Схожесть структуры прокариотных сообществ исследуемых образцов по методу Bray-Curtis в виде двумерных диаграмм (метод главных компонент) при формировании ОТЕ на основе 97% (1), 94 % (2), 91 % (3), 88 % (4), 85 % (5), 82 % (6) сходства. А – современная каштановая почва; В - современная каштановая почва, инкубированная с хитином; С – почва, погребенная 3500 л.н.; D - почва, погребенная 3500 л.н., инкубированная с хитином; Е - почва, погребенная 3500 л.н.; F - почва, погребенная 4500 л.н., инкубированная с хитином; G – многолетнемерзлый грунт; H - многолетнемерзлый грунт, инкубированный с хитином.

Анализ методом главных компонент с применением метрики Брея-Кертиса на уровне сходства 97% (Рис. 20) разделил исследуемые сообщества на четыре

кластера: «современная почва (контрольные образцы)+современная почва (образцы с хитином)», «почва, погребенная 3500 лет назад (контрольные образцы)+почва, погребенная 4500 лет назад (контрольные образцы)», «почва, погребенная 3500 лет назад (образцы с хитином)+почва, погребенная 4500 лет назад (образцы с хитином)», «погребенные многолетнемерзлые грунты (контрольные образцы)+погребенные многолетнемерзлые грунты (образцы с хитином)». Такое разделение говорит о том, что при внесении субстрата доминанты гидролитического сообщества различаются между образцами разного возраста погребения. Также, контрольные образцы погребенных почв и образцы погребенных почв, инкубировавшиеся в присутствии субстрата, были разделены на разные кластеры, что говорит о том, что внесение субстрата гораздо сильнее изменяет структуру прокариотного сообщества погребенных образцов, чем современных. Достоверность различия гидролитических сообществ современных почв, погребенных почв и многолетнемерзлых грунтов подтвердилось анализом PERMANOVA ($p < 0,05$). При разделении образцов при меньшем проценте сходства, разделение на кластеры постепенно нивелируется, что говорит о том, что различие в доминантах хитинолитического сообщества происходит на уровне родов, но не семейств.

Для подробного изучения доминирующих родов гидролитического сообщества был проведен анализ теплокарты, построенной на основании доли последовательностей, относящихся к роду, от общего количества последовательностей после выравнивания. Всего было выявлено 39 родов, доминировавших в разной степени в изучаемых образцах (Рис. 21). В образцах современных почв доминировали типичные роды почвенных бактерий – *Streptomyces*, *Rubrobacter*, *Chitinophaga*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Devosia*, *Rhodoplanes*, *Kaistobacter*, *Sphingomonas*, *Janthinobacterium*, *Steroidobacter*, *Lysobacter*, *Thermomonas*. При внесении субстрата в доминанты выходили роды *Agromyces*, *Bacillus*, *Solibacillus*, *Sphingobium*, *Variovorax*, *Acinetobacter*. Все роды являются убиквитарными, ни один род не может быть охарактеризован, как облигатный гидролитик.

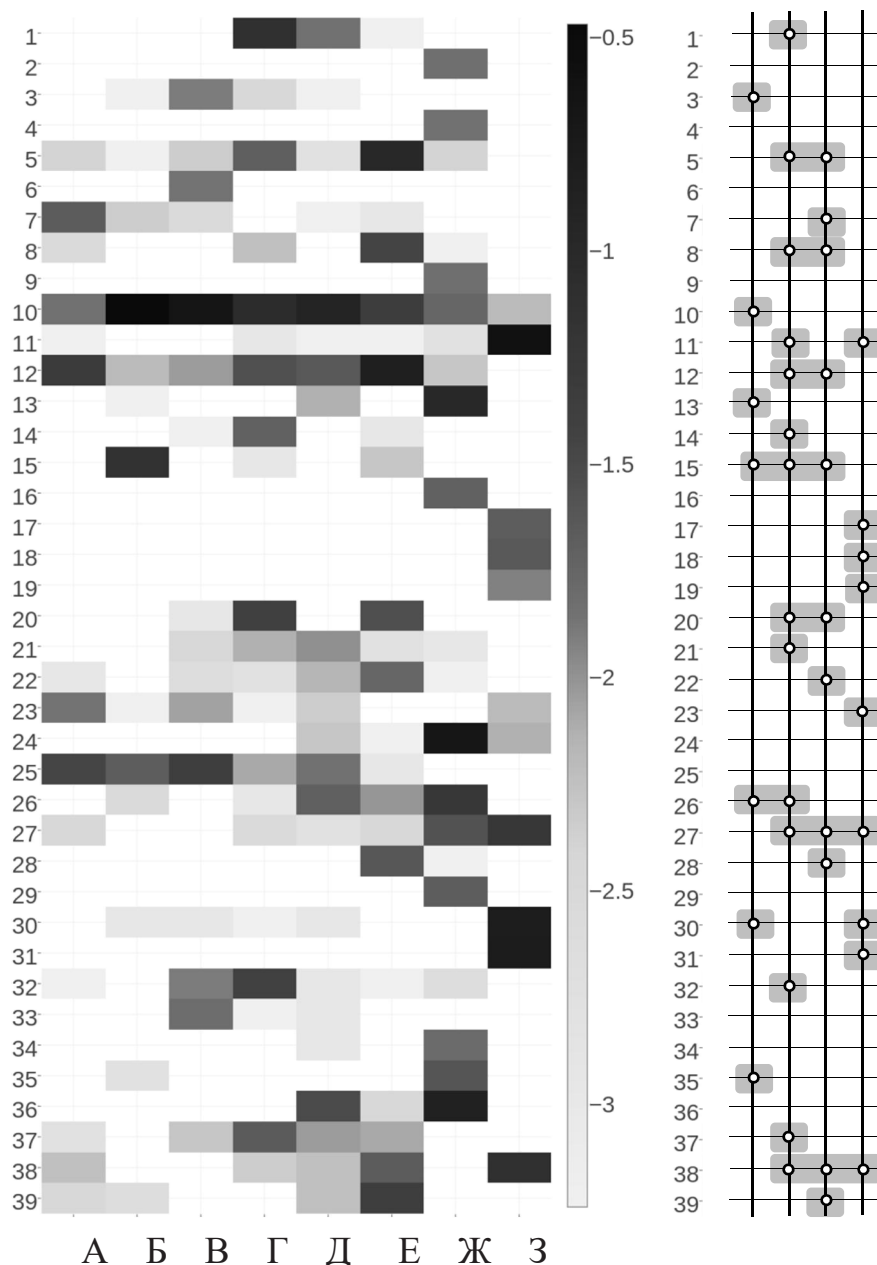


Рис. 21. Доминирующие роды прокариот в исследованных образцах и их относительная доля, проиллюстрированная с помощью (ОТЕ выделены на уровне 97% сходства; приведены только ОТЕ, идентифицированные на уровне рода; за доминантные приняты роды, составляющие более 1% от всех выделенных ОТЕ; на рисунке приведены значения десятичного логарифма от доли рода). На схеме справа приведены роды, относительная доля которых увеличивается при внесении хитина. А – современная каштановая почва; Б - современная каштановая почва; инкубированная с хитином; В – почва, погребенная 3500 л.н.; Г - почва, погребенная 3500 л.н., инкубированная с хитином; Д - почва, погребенная 3500 л.н.; Е - почва, погребенная 4500 л.н., инкубированная с хитином; Ж – многолетнемерзлый грунт; З - многолетнемерзлый грунт, инкубированный с хитином. Роды: 1 – *Saccharothrix*, 2 – *Corynebacterium*, 3 – *Agromyces*, 4 – *Rhodococcus*, 5 – *Streptomyces*, 6 – *Euzebya*, 7 – *Rubrobacter*,

8 – *Chitinophaga*, 9 – *Sediminibacterium*, 10 – *Bacillus*, 11 – *Brevibacillus*, 12 – *Paenibacillus*, 13 – *Bacillus* (rRNA group 2), 14 – *Paenisporosarcina*, 15 – *Solibacillus*, 16 – *Staphylococcus*, 17 – *Clostridium*, 18 – *Coprococcus*, 19 – *Sedimentibacter*, 20 – *Mycoplasma*, 21 – *Phenylobacterium*, 22 – *Devosia*, 23 – *Rhodoplanes*, 24 – *Rhizobium*, 25 – *Kaistobacter*, 26 – *Sphingobium*, 27 – *Sphingomonas*, 28 – *Achromobacter*, 29 – *Schlegelella*, 30 – *Variovorax*, 31 – *Cupriavidus*, 32 – *Janthinobacterium*, 33 – *Peredibacter*, 34 – *Halomonas*, 35 – *Acinetobacter*, 36 – *Pseudomonas*, 37 – *Steroidobacter*, 38 – *Lysobacter*, 39 – *Thermomonas*

Прокариотное сообщество погребенных почв характеризуется доминированием представителей филума *Actinobacteria*, которое становится более выраженным при внесении субстрата. Среди родов привлекают внимание род *Phenylobacterium* (McIlroy, Nielsen, 2014) эффективно разлагающий хлоридазон, антипирин и пирамидон, являющиеся активными трудноразлагаемыми компонентами гербицидов, и род *Janthinobacterium*, известный своими бактерицидными, фунгицидными и вирицидными свойствами благодаря высокому содержанию виолацеина в клетках (Pantanella et al., 2007). Также, стоит отметить доминирование рода *Chitinophaga*, являющегося продуцентом нового антибиотика фальцитидина, обладающего активностью в отношении малярии, в образцах с субстратом (Somanadhan et al., 2013).

Многолетнемерзлые грунты отличаются по родовому составу от почв. Так, доминирующим родом в образцах грунтов становится *Sediminibacterium*, отсутствовавший в почвенных образцах. Гидролитической активностью обладали роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes*, *Cupriavidus*, отсутствовавшие в почвенных образцах. Роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes* являются облигатными анаэробами (Hiraishi, Ueda, 1994).

В целом, доминантные роды гидролитического сообщества различались между современными почвами, погребенными почвами и многолетнемерзлыми грунтами, хотя присутствуют и общие доминанты.

5.6. Метагеномный анализ прокариотных микробных сообществ исследуемых почв и грунтов (функциональная структура сообщества)

Наибольшее число генов (>50%) во всех исследуемых образцах было определено как кодирующие белки различных метаболитных путей (Таблица 9). Далее следуют гены, кодирующие процессинг генетической информации (15-18%) и взаимодействие сообщества с окружающей средой (13-17%). По функциональной структуре все исследуемые образцы, как без субстрата, так и с внесением хитина, различаются не сильно. Наибольшее количество функциональных генов метаболических путей кодирует синтез аминокислот и энергетический метаболизм. Уровень процессинга генетической информации снижен в многолетнемерзлых грунтах по сравнению с погребенными и современными почвами, а уровень процессинга сигналов окружающей среды повышен. Поскольку оценка производилась после реактивации микробного сообщества, такое распределение функций косвенно подтверждает увеличение активности сообщества по мере увеличения глубины залегания и возраста образцов. Также, в многолетнемерзлых грунтах повышено содержание генов, кодирующих процессы клеточной смерти и клеточного роста по сравнению с погребенными и современными почвами. В целом, практически все процессы в многолетнемерзлых грунтах снижены, по сравнению с почвами, однако способность к биodeградации ксенобиотиков возрастает от современных почв к многолетнемерзлым грунтам, что говорит о высоком биотехнологическом потенциале погребенных местообитаний (Рис. 22).

Классификация KEGG Уровень 1	Классификация KEGG Уровень 2	Совр.п очва	Совр. почва+ хитин	почва, погр. 3500 л.н.	почва, погр. 3500 л.н.+хит ин	почва, погр. 4500 л.н.	почва, погр. 4500 л.н.+хит ин	Многол етнемер з.грунт	Многол етнемер з.грунт+ хитин
Клеточные процессы (Cellular Processes)	Клеточная коммуникация	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Клеточный рост и клеточная смерть	0,53%	0,36%	0,55%	0,56%	0,66%	0,47%	0,78%	0,54%
	Движение клетки	2,83%	2,85%	3,04%	3,10%	3,41%	2,38%	3,34%	3,53%
	Транспорт и катаболизм	0,37%	0,27%	0,34%	0,38%	0,32%	0,43%	0,31%	0,31%
	Другие	3,28%	4,59%	3,49%	3,71%	3,76%	3,53%	3,67%	3,78%
	Всего	7,01%	8,06%	7,43%	7,76%	8,16%	6,80%	8,10%	8,16%
Процессинг информации окружающей среды (Environmental Information Processing)	Транспорт через мембрану	10,94 %	14,72%	11,62%	11,24%	11,58%	13,35%	15,10%	15,21%
	Трансдукция сигнала	2,15%	2,46%	2,22%	2,29%	2,37%	2,11%	2,42%	2,52%
	Сигнальные молекулы и взаимодействие	0,20%	0,15%	0,17%	0,21%	0,18%	0,24%	0,19%	0,20%
	Всего	13,29 %	17,34%	14,02%	13,74%	14,13%	15,70%	17,71%	17,93%
Процессинг генетической информации (Genetic Information Processing)	Фолдинг, сортинг и деградация полипептидных цепей	2,22%	2,07%	2,19%	2,08%	2,20%	2,00%	1,85%	1,83%
	Репликация и восстановление	6,71%	6,39%	6,81%	6,51%	6,83%	6,15%	5,77%	5,69%
	Транскрипция	2,50%	3,03%	2,64%	2,57%	2,37%	2,65%	2,42%	2,32%
	Трансляция	4,13%	3,77%	4,19%	3,73%	4,18%	3,50%	3,29%	3,39%
	Другие	2,24%	2,29%	2,23%	2,00%	2,32%	1,99%	2,07%	2,07%
	Всего	17,80 %	17,55%	18,06%	16,89%	17,90%	16,29%	15,40%	15,30%
Метаболизм (Metabolism)	Метаболизм аминокислот	11,06 %	9,93%	11,09%	11,17%	10,83%	10,86%	10,41%	10,68%
	Биосинтез прочих вторичных метаболитов	1,12%	0,81%	1,02%	1,07%	0,96%	1,10%	0,96%	0,81%
	Метаболизм углеводов	10,61 %	10,25%	10,33%	10,14%	9,76%	10,50%	9,83%	9,62%

	Энергетический метаболизм	5,72%	4,97%	5,52%	5,17%	5,71%	5,19%	5,00%	4,97%
	Ферменты	2,02%	2,14%	2,06%	2,02%	2,04%	2,01%	1,64%	1,73%
	Биосинтез и метаболизм гликанов	1,95%	1,84%	1,72%	1,59%	1,80%	1,68%	1,52%	1,45%
	Метаболизм липидов	4,27%	3,61%	4,11%	4,41%	3,94%	4,46%	3,97%	4,03%
	Метаболизм витаминов и кофакторов	4,19%	3,86%	4,14%	4,00%	4,26%	3,85%	3,79%	3,66%
	Метаболизм прочих аминокислот	1,98%	1,82%	1,97%	2,11%	2,03%	2,04%	2,07%	2,22%
	Метаболизм терпеноидов и поликетидов	2,42%	1,98%	2,35%	2,55%	2,27%	2,51%	2,08%	2,14%
	Метаболизм нуклеотидов	3,13%	2,96%	3,13%	3,00%	3,11%	2,93%	2,89%	2,69%
	Биодеградация и метаболизм ксенобиотиков	4,10%	3,27%	3,97%	4,60%	3,82%	4,49%	4,91%	5,07%
	Другие	2,53%	2,81%	2,41%	2,65%	2,43%	2,57%	2,72%	2,74%
	Всего	55,11 %	50,23%	53,81%	54,50%	52,94%	54,18%	51,80%	51,82%
	Неклассифицированные либо ошибочно классифицированные	6,79%	6,82%	6,68%	7,11%	6,87%	7,02%	6,99%	6,80%

Таблица 9. Функциональная структура микробного сообщества исследуемых почв (KEGG классификация уровень 1 и 2, относительные величины).

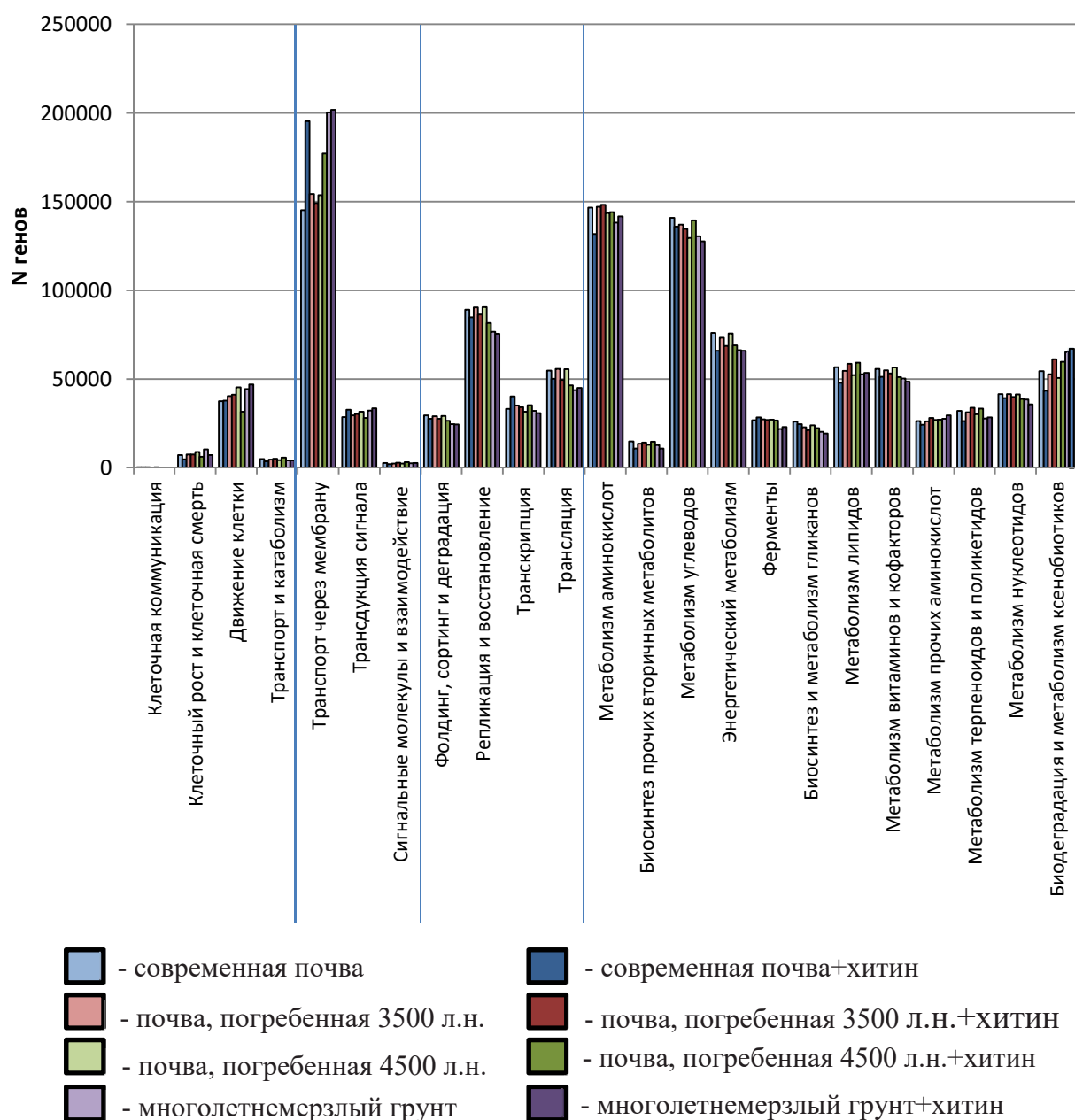


Рис. 22. Функции микробного сообщества исследуемых образцов (KEGG классификация уровень 2, абсолютные величины)

При более подробном рассмотрении процессов, проводимых микробным сообществом, можно условно разделить все кодирующие гены на большие группы: отвечающие за клеточные процессы, осуществляющие взаимодействие клеток с окружающей средой, кодирующие разные стадии геномного процессинга и обеспечивающие метаболизм.

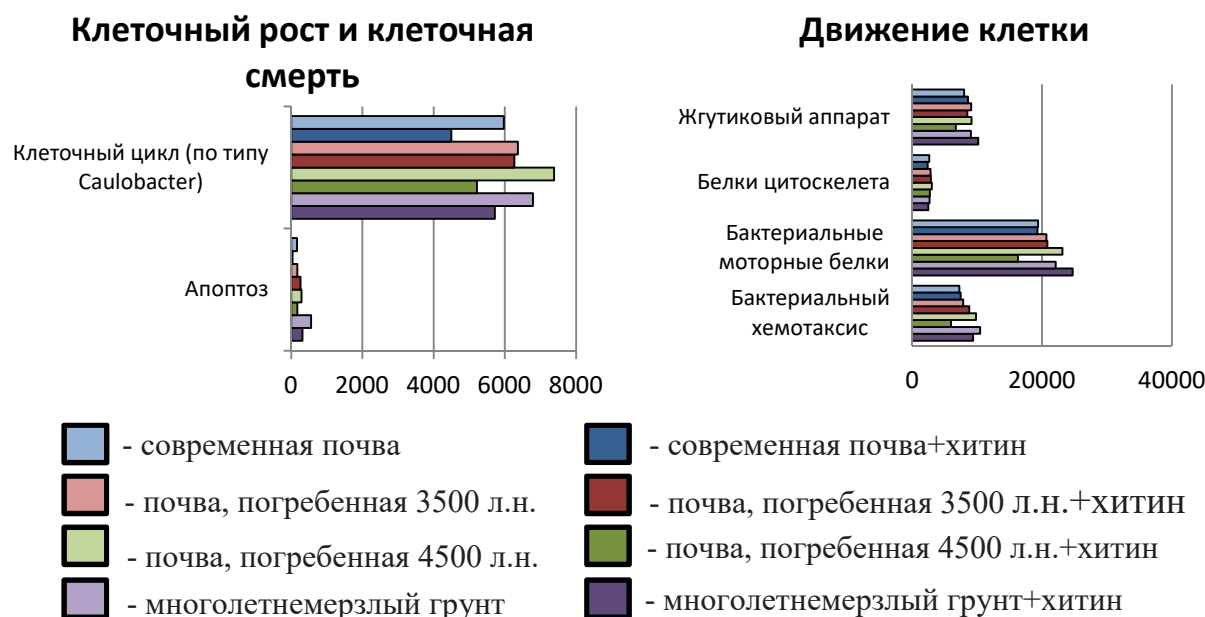


Рис. 23. Основные клеточные процессы, осуществляемые микробными сообществами исследуемых почв и грунтов.

Клеточные процессы (Рис. 23). Количество генов, кодирующих клеточный цикл по типу *Caulobacter*, увеличивается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Бактерия *Caulobacter crescentus* как модельный организм для изучения клеточного цикла интересна потому, что клеточный цикл этой бактерии наиболее близок к эукариотическому: имеются четко выраженные G1, S и G2 периоды; более того, в результате деления образуются неравноценные клетки (т.е. наблюдается некоторая дифференцировка) – одна из дочерних клеток имеет жгутик и аппарат хемотаксиса (клетки «швермеры», не способные к размножению), а другая неподвижна и остается прикрепленной к субстрату, осуществляя дальнейшее размножение (Олескин, Ботвинко, Цавкелова, 2000). Увеличение количества генов, кодирующих клеточный цикл по типу *Caulobacter* может косвенно свидетельствовать о большей приспособленности сообщества в погребенных местообитаниях к освоению территории (клетки-«швермеры» при росте колонии на чашках обеспечивают рост колонии вширь) ввиду олиготрофности условий.

Процессы апоптоза также становятся более сильно выраженными в погребенных почвах по сравнению с современными и в многолетнемерзлых грунтах по сравнению с почвами. Процессы, связанные с движением клетки (хемотаксис, наличие бактериальных моторных белков) проявляются сильнее при внесении субстрата в образцы и примерно одинаково во всех образцах почв и грунтов. Следовало ожидать снижение двигательных белков в образцах многолетней мерзлоты, однако следует помнить, что наличие генов, кодирующих белок не обязательно свидетельствует о его экспрессии.

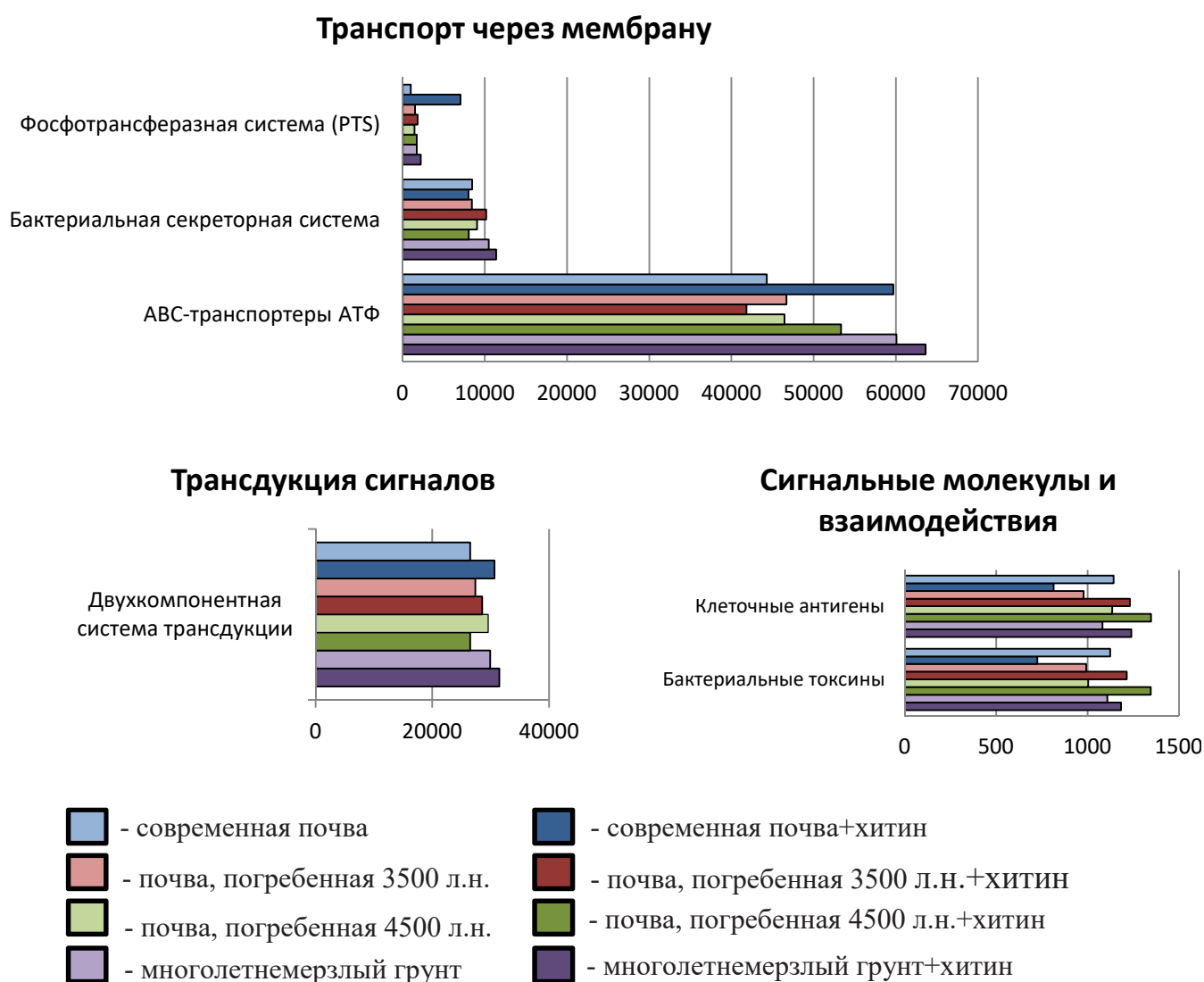


Рис. 24. Основные процессы взаимодействия с окружающей средой, осуществляемые микробными сообществами исследуемых почв и грунтов

Взаимодействие с окружающей средой (Рис. 24). Процесс транспорта через мембрану, в целом, не различается между образцами исследованных почв и слегка повышен в образцах многолетнемерзлых грунтов. Фосфоенолпируват (ФЕП)-зависимая фосфотрансферазная система (PTS) является одним из основных механизмов, используемых бактериями для усваивания углеводов, в частности, гексоз, гекситолов и дисахаридов, используя ФЕП в качестве источника энергии. PTS катализирует усваивание углеводов и их превращение в соответствующие фосфоэфиры в процессе транспорта. Количество генов, кодирующих систему PTS не различается между образцами.

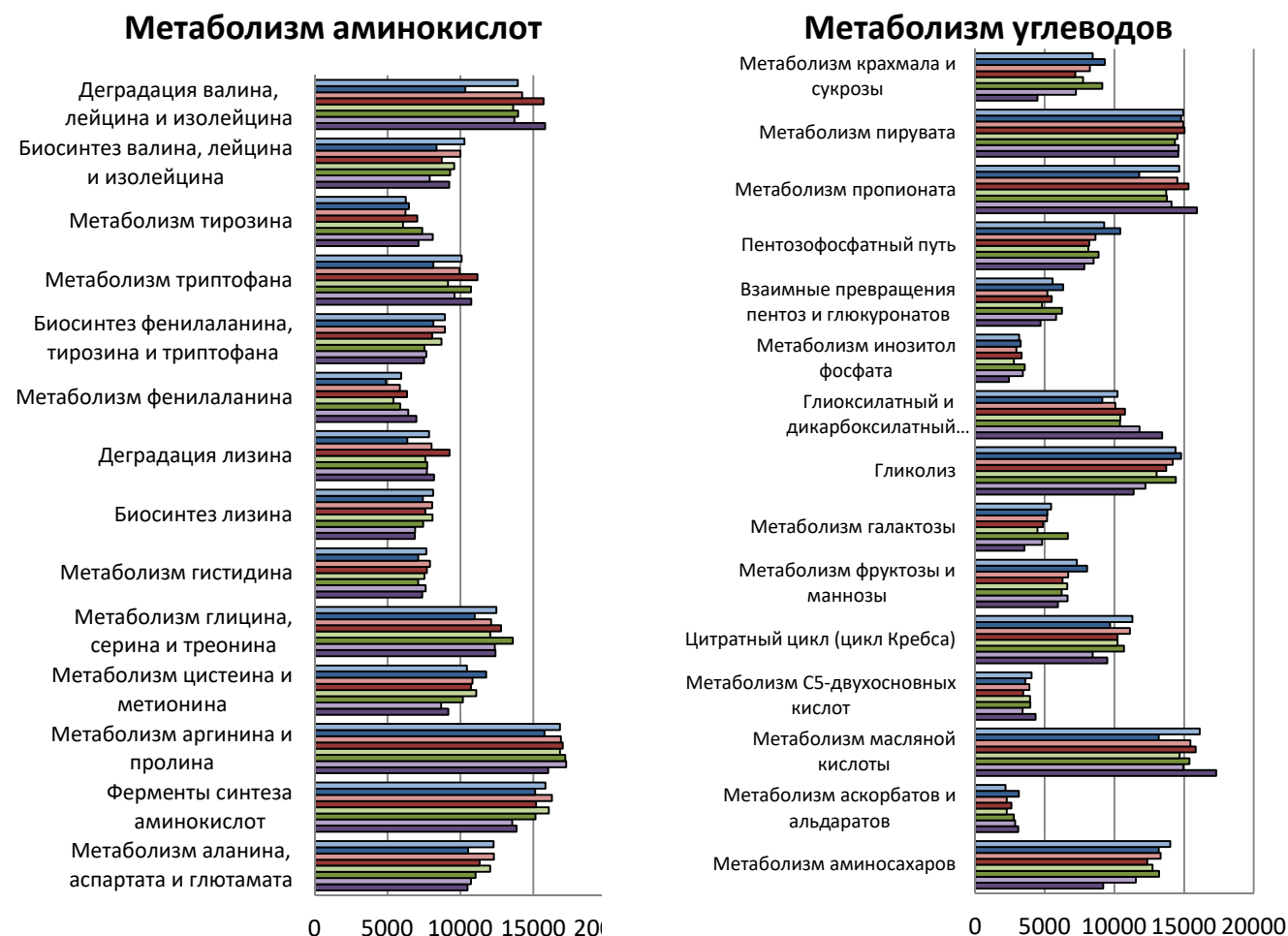
Бактериальная секреция незначительно повышена в образцах многолетнемерзлых грунтов.

Аденозин-трифосфат (АТФ) - связанные кассетные транспортеры (adenosine triphosphate binding cassette - ABC), составляют самую многочисленную семью трансмембранных протеинов, которые используют полученную от АТФ энергию для активного транспорта различных субстанций через клеточные мембраны. Активный транспорт повышен в образцах с субстратом по сравнению с контрольными образцами и повышен в образцах многолетнемерзлых грунтов по сравнению с почвенными образцами, что может быть связано с низкой активностью воды в данных местообитаниях и связанной с этим затрудненностью транспорта ионов через мембрану.

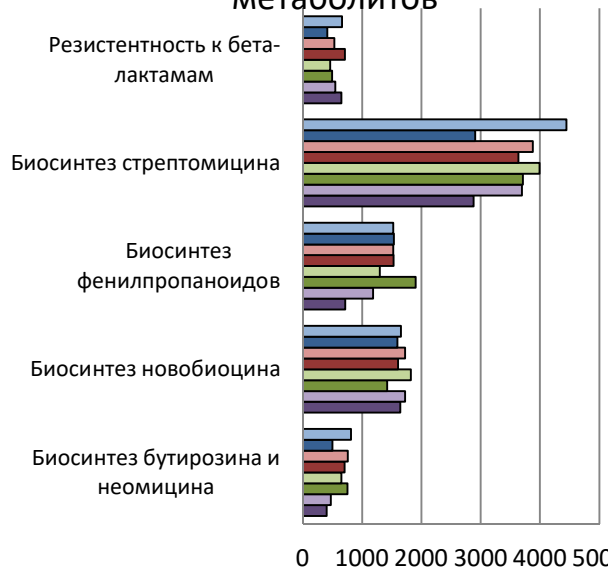
Двухкомпонентная система трансдукции сигнала позволяет бактериям чувствовать, отвечать и адаптироваться к изменениям окружающей среды или изменению во внутриклеточных процессах. Каждая двухкомпонентная система состоит из сенсорной белково-гистидиновой киназы и регулятора ответа. Активация регулятора ответа обычно приводит к изменениям клеточной физиологии путем регуляции экспрессии тех или иных генов. Например, двухкомпонентная сигнальная система у патогенных микроорганизмов может приводить к инициации паразитического образа жизни и развитию инфекционного заболевания, а также формированию антибиотикорезистентности.

В целом, количество генов, кодирующих двухкомпонентную систему трансдукции сигнала, слабо различается между образцами.

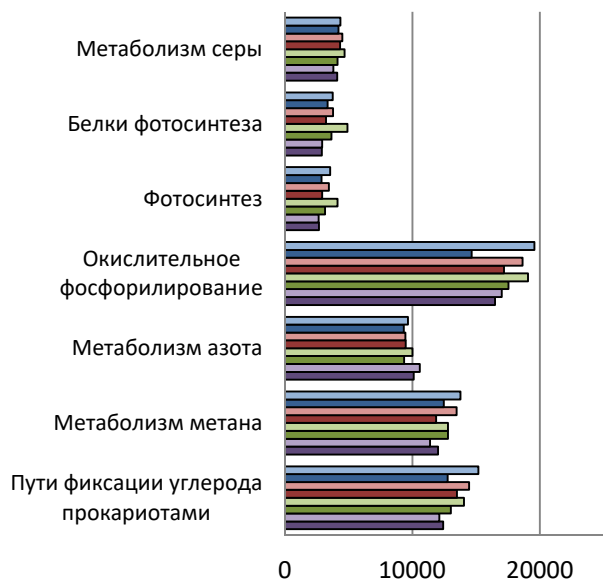
Количество генов, кодирующих сигнальные взаимодействия между клетками, изменяется при сравнении образцов, однако какой-либо систематической тенденции выявлено не было.



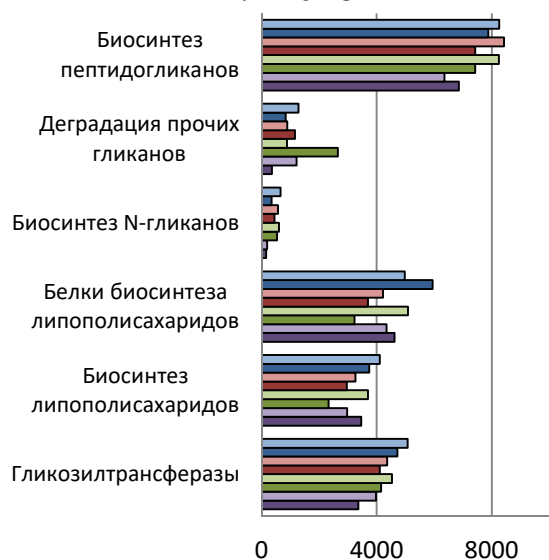
Биосинтез прочих вторичных метаболитов



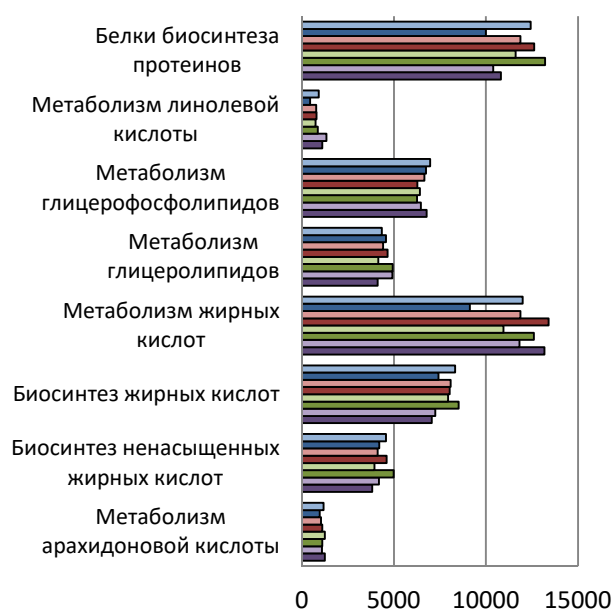
Энергетический метаболизм



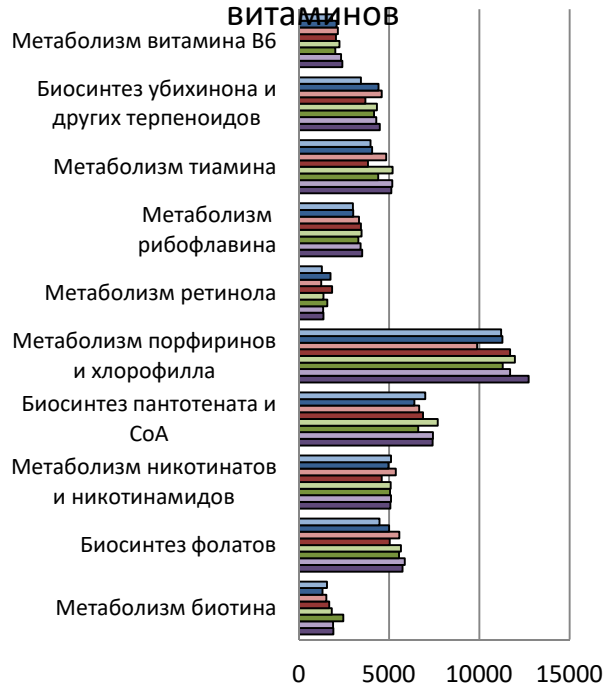
Биосинтез и метаболизм гликанов



Метаболизм липидов



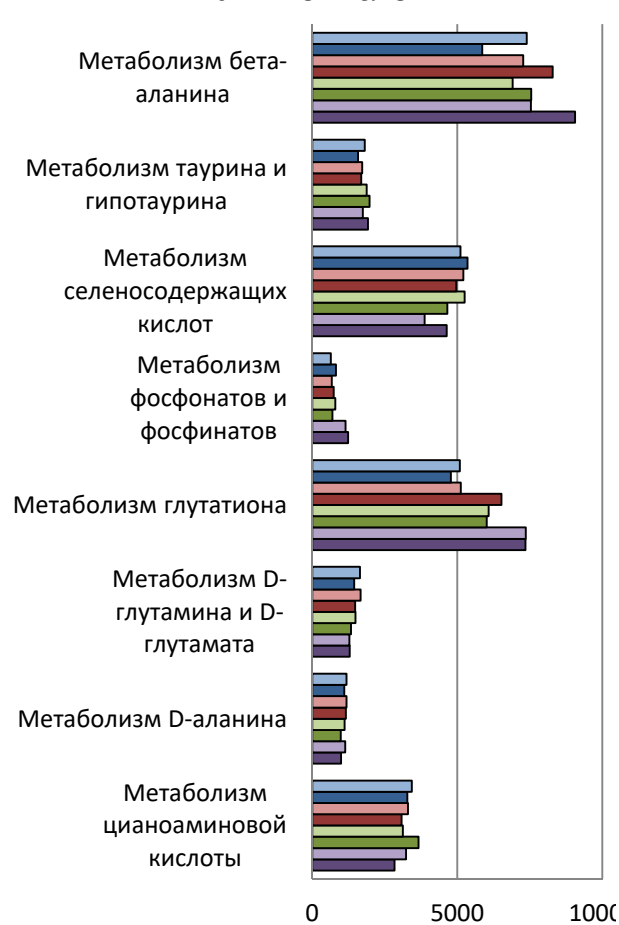
Метаболизм кофакторов и витаминов



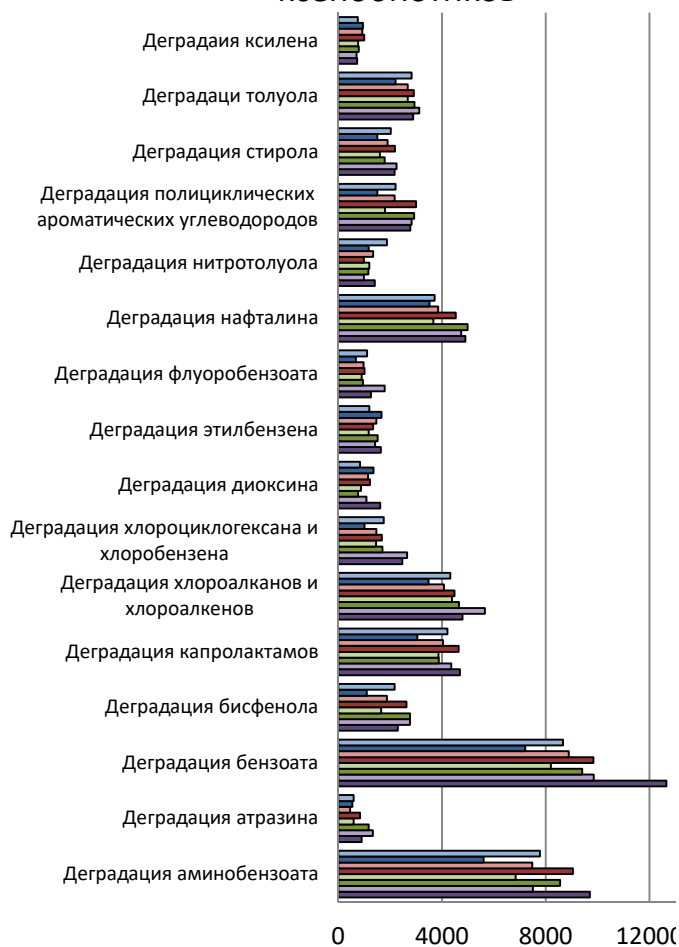
Метаболизм терпеноидов и поликетидов



Метаболизм прочих аминокислот



Биодеградация и метаболизм ксенобиотиков



Метаболизм нуклеотидов

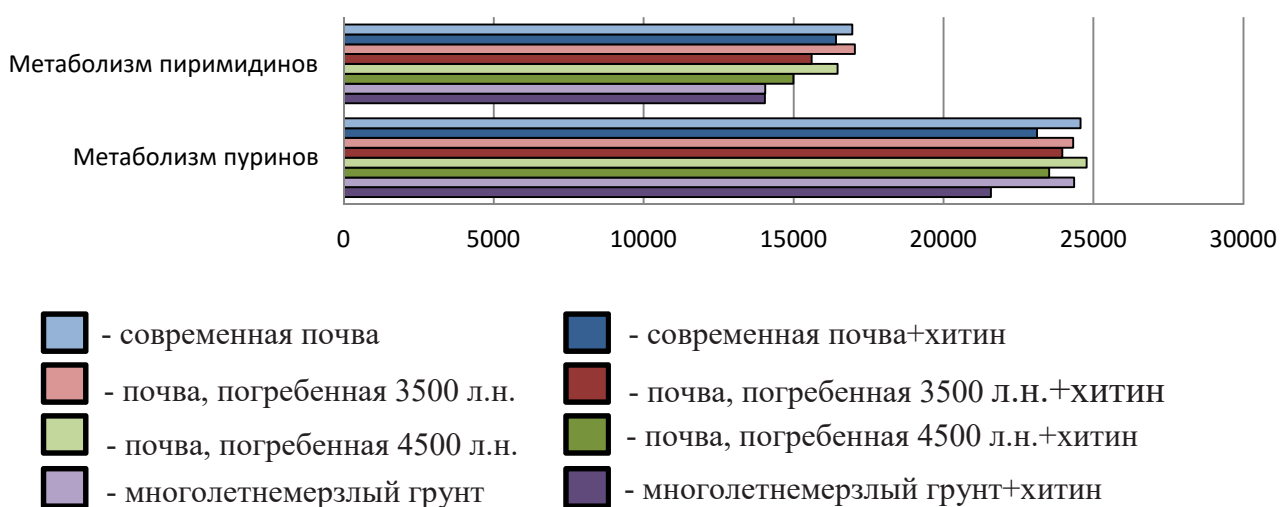


Рис. 25. Основные метаболические процессы, осуществляемые микробными сообществами исследуемых почв и грунтов.

Метаболизм (Рис. 25). Биосинтез аминокислот либо не различается между исследуемыми образцами, либо снижается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам (например, синтез валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, аланина, аспартата и глутамата). Внесение субстрата не оказывает влияния на количество выявленных генов синтеза аминокислот, наблюдается только небольшое повышение количества генов синтеза триптофана. Также, наблюдается повышение содержания глутатиона в клетках по мере увеличения возраста образца. Глутатион является антиоксидантом, накапливающимся в клетках в целях защиты от окислительного стресса (Blokhina, Virolainen, Fagerstedt, 2003).

Наблюдается снижение всех процессов усвоения углеводов аэробным способом в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. По мере продвижения вглубь наблюдается увеличение количества генов, кодирующих метаболизм бутаноатов и пропаноатов. Также, наблюдается повышение количества генов, ответственных за глиоксилатный шунт, что также может быть рассмотрено как приспособление к выживанию в условиях ограниченности субстратов, поскольку наличие глиоксилатного шунта позволяет

микроорганизмам использовать жирные кислоты и ацетат в качестве единственного источника углерода.

Биосинтез вторичных метаболитов, к которым относятся такие антибиотики, как стрептомицин, новобиоцин, бутирозин, неомицин снижается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Несмотря на то, что ранее было выявлено, что штаммы, выделенные из многолетнемерзлых грунтов обладают большей антибиотикоустойчивостью (Кряжевских и др., 2013), количество генов, кодирующих резистентность к бета-лактамам не различалось в исследуемых образцах. Количество генов, кодирующих фотосинтез и окислительное фосфорилирование также закономерно снижалось при переходе от современных почв к погребенным и от погребенных к многолетнемерзлым породам. В многолетнемерзлых породах количество генов, кодирующих превращения азота повышено.

Метаболизм липидов слабо различается между образцами, однако в образцах многолетнемерзлых грунтов повышен синтез глицерофосфолипидов и метаболизм жирных кислот.

Уровень метаболизма кофакторов и витаминов в целом повышается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Биосинтез антибиотиков группы тетрациклина и ванкомицина примерно одинаков во всех образцах.

Метаболизм пуринов и пиримидинов снижается от современных почв к погребенным и снижен в присутствии субстрата. Это согласуется с тенденцией к снижению процессинга генетической информации в целом.

Уровень метаболизма ксенобиотиков повышается от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Это касается таких ксенобиотиков как толуол, стирол, полициклические ароматические углеводороды, нафталин, флуоробензоат, диоксин, хлороциклогексан, хлорбензен, хлоралканы и хлоралкены, капролактамы, бисфенолы, бензоат, атразин и аминокбензоат. При внесении субстрата повышается количество генов, ответственных за метаболизм полициклических ароматических углеводородов, нафталина, диоксида, хлороциклогексана, хлорбензена, капролактамов, бензоата и аминокбензоата.

Увеличение интенсивности разложения ксенобиотиков показано в работе Соляниковой и др., где при переводе штамма *Pseudomonas fluorescens* в покоящееся состояние и последующем выводе из него происходило выщепление фенотипов, характеризовавшихся более высокой скоростью роста на ароматических субстратах (Соляникова и др., 2013). Поскольку известным является факт, что для биоремедиации целесообразно использовать не отдельные штаммы бактерий-деструкторов, а активные ассоциации, погребенные местообитания могут иметь биотехнологический потенциал для ремедиации загрязнений ксенобиотиками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа дополняет ранее полученные данные исследований реликтовых микробных сообществ, а также выявляет ранее неизвестные особенности таких микробных комплексов. Ранее, исследования древних сообществ были ограничены в связи с несовершенством методологической базы. Нахождение большинства видов в покаящейся форме позволяло охарактеризовать только малую часть микробного разнообразия местообитаний такого типа. Микроорганизмы, которые поддавались культивированию, изучались индивидуально в чистых культурах, что обеспечило понимание функционирования каждого отдельного штамма, но отражало собственно активность микробного комплекса с учетом взаимодействий между микроорганизмами и взаимодействий клеток с окружающей природной средой. Используемые в работе методы реактивации покаящихся форм с последующей инициацией микробной сукцессии позволяют применить экологический подход к труднореактивируемым сообществам, исследовать развитие микробного комплекса в условиях по крайней мере частичного сохранения его целостности. Примененный комплекс методов классической микробиологии и новых молекулярно-биологических методов позволяет наиболее полно охарактеризовать метаболически активное прокариотное сообщество погребенных почв и объектов криосферы.

Погребенные почвы, по-видимому, впервые стали объектом изучения метагеномики. Анализ данных высокпроизводительного секвенирования гена 16S рРНК и последующее восстановление функционального генетического комплекса позволил выявить основных доминантов гидролитического сообщества древних почв и многолетнемерзлых грунтов. Предположительно, доминанты древних гидролитических сообществ могут обладать более высокой активностью по сравнению с их коллекционными аналогами. Из погребенных образцов выделены штаммы, обладающие высокой гидролитической активностью, которые могут быть использованы в дальнейшем для биотехнологических целей (например, для создания биопрепаратов при борьбе с фитопатогенами).

Выявленное возрастание потенциальной активности сообществ по мере увеличения степени «законсервированности» сообщества открывает возможности для биотехнологического использования штаммов, выделенных из погребенных и многолетнемерзлых местообитаний. Проведенное исследование, по-видимому, является одним из наиболее комплексных и полных работ, посвященных древним микробным комплексам.

ВЫВОДЫ

1. Последовательное применение процедур реактивации клеток покоящегося сообщества и инициации развития физиологической группы гидролитиков позволило обнаружить прокариотный комплекс, способный к реверсии метаболической деятельности. В образцах криосферы и погребенных палеопочв реактивировано прокариотное мезофильное органотрофное сообщество.

2. Определена структура и выявлены специфические особенности функционального микробного комплекса исследуемых образцов. Выявлено, что потенциальная активность микробного гидролитического сообщества возрастает в ряду сообщества современных почв – сообщества погребенных палеопочв. Наиболее высокая потенциальная активность прокариотного сообщества обнаружена в многолетнемерзлых грунтах.

3. Впервые молекулярно-биологическими методами (метагеномного анализа и гибридизацией клеток *in situ*) установлены различия в филогенетической структуре прокариотной метаболически активной гидролитической компоненты многолетнемерзлых грунтов и палеопочв. В современных почвах гидролитический комплекс более разнообразен по сравнению с погребенными почвами и криогенными образцами, где в качестве доминантов-гидролитиков выступают представители групп *Actinobacteria* (как одноклеточные, так и мицелиальные представители), *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

4. По результатам анализа методом главных компонент в современных почвах, палеопочвах и многолетнемерзлых грунтах состав доминирующих родов гидролитического прокариотного сообщества различен. В современных почвах доминантными являются роды *Agromyces*, *Bacillus*, *Solibacillus*, *Sphingobium*, *Variovorax*, *Acinetobacter*, в погребенных *Streptomyces*, *Rubrobacter*, *Chitinophaga*, *Paenibacillus*, *Mycoplana*, *Jathinobacterium*, в многолетнемерзлых грунтах *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes*, *Cupriavidus*.

5. Выявлено, что число функциональных генов, маркирующих процессы биodeградации ксенобиотиков, возрастает от современных почв к погребенным.

Наибольшее число функциональных генов, маркирующих процессы биodeградации ксенобиотиков обнаружено в образцах многолетнемерзлых грунтов, что говорит о высоком биотехнологическом потенциале реликтовых микробных сообществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Л.К. Изучение микробного разнообразия почв с помощью сукцессионного анализа: Автореферат диссертации кан. биол. наук. М.: МГУ, 2001. – 23 с.
2. Антонюк Л.П. Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005. С. 118–159.
3. Беспалов М.М., Колпаков А.И., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Варламова Е., Курганов Б., Эль-Регистан Г.И. Функции аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов при создании метаболического блока в клетке // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 217–223.
4. Благодатская Е.В., Хохлова О.С., Андерсон Т.-Х., Благодатский С.А. Пул экстрагируемой микробной ДНК и микробиологическая активность палеопочв Южного Приуралья // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 847–853.
5. Власенко А.Н. Микробная деградация полисахаридов в почвах при различных температурах: Дис. канд. биол. наук. - М.: МГУ, 2011. – 159 с.
6. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
7. Головченко А.В., Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г. Микробиологические основы оценки торфяника как профильного почвенного тела // Вестник Томского Государственного педагогического университета. 2008. Т. 4. № 78. С. 46–53.
8. Губин С.В., Занина О.Г., Максимович С.В. Реконструкция условий формирования отложений ледового комплекса по результатам изучения позднеплейстоценовых нор грызунов // Криосфера Земли. 2003. Т. 7. № 3. С. 13–22.
9. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 616–625.

10. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. Длительное сохранение ДНК в водных растворах в присутствии химических аналогов микробных ауторегуляторов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 662–669.
11. Демкин В.А. Палеопочвоведение и археология: интеграция в изучении истории природы и общества. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1997. 213 с.
12. Демкин В.А., Борисов А.В., Удальцов С.Н. Палеопочвы и климат Юго-Востока Среднерусской возвышенности эпохи Средней и Поздней Бронзы (XXV–XV вв. до н.э.) // Почвоведение. 2010. № 1. С. 7–17.
13. Демкин В.А., Демкина Т.С., Борисов А.В. Что хранят древние природные «архивы»? // Наука в России. 2005. Т. 1. С. 34–39.
14. Демкин В.А., Скрипкин А.С., Ельцов М.В., Золотарева Б.Н., Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Кузнецова Т.В., Удальцов С.Н., Каширская Н.Н., Плеханова Л.Н. Природная среда Волго-Уральских степей в Савромато-Саматскую эпоху (VI в. н.э. – IV в. н.э.). Пушкино: Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Волгоградский государственный университет, 2012. 216 с.
15. Демкина Е.В., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Arthrobacter globiformis* в автолизирующихся суспензиях // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 383–388.
16. Демкина Т.С., Борисов А.В., Демкин В.А. Микробиологические исследования подкурганных палеопочв пустынно-степной зоны Волго-Донского междуречья // Почвоведение. 2004. № 7. С. 853–859.
17. Демкина Т.С., Борисов А.В., Ельцов М.В., Демкин В.А. Сравнительная характеристика микробных сообществ курганных насыпей, подкурганных и современных почв степной зоны Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2007. № 6. С. 738–748.
18. Демкина Т.С., Попова И.В., Демкин В.А. Характеристика микробных сообществ современных и подкурганных почв солонцовых комплексов сухих степей Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2013. № 7. С. 840–849.

19. Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Демкина Е.В., Каширская Н.Н. Интеграция почвенной микробиологии и археологии в изучении палеоклиматических условий степей нижнего Поволжья в голоцене // Историческая география России: ретроспектива и современность комплексных региональных исследований. Материалы V международной конференции по исторической географии, 2015. С. 288–291.
20. Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Каширская Н.Н., Стретович И.В., Демкин В.А. Микробиологические исследования палеопочв археологических памятников степной зоны // Почвоведение. 2010. № 2. С. 213–220.
21. Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Кузнецова Т.В., Контобойцева А.А., Борисов А.В. Характеристика микробных сообществ погребенных почв Царицынской оборонительной линии (1718–1720 гг.) // Почвоведение. 2016. № 1. С. 65.
22. Дмитриев В.В., Гиличинский Д.А., Файзутдинова Р.Н., Шершунов И.Н., Голубев В.И., Дуда В.И. Обнаружение жизнеспособных дрожжей в грунтах вечной мерзлоты Сибири возрастом около 3 млн.лет // Микробиология. 1997. Т. 66. № 5. С. 655–660.
23. Дмитриев В.В., Сузина Н.Е., Барина Е.С., Дуда В.Е., Боронин А.М. Электронно-микроскопическое изучение ультраструктуры микробных клеток *in situ* в экстремальных биотопах // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 832–840.
24. Добровольский Г.В., Макеев А.О. Палеонтология и палеопочвоведение // Доклады по экологическому почвоведению. 2009. Т. 1. № 11. С. 95–125.
25. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Т., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811–819.
26. Желифонова В.П., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Козловский А.Г. Вторичные метаболиты грибов рода *Penicillium*, выделенных из многолетней мерзлоты, как хемотаксономические маркеры // Микробиология. 2009. Т. 78. № 3. С. 393–398.

27. Заварзин Г.А. Смена парадигм в биологии // Вестник РАН. 1995. Т. 1.
28. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: Изд-во ГЕОС, 2001. 256 с.
29. Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г., Судницын И.И. Развитие актиномицетов при низкой влажности окружающей среды. М.: Университетская книга, 2014. 94 с.
30. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Шмидт М.А., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе стафилококков на стрессовые воздействия // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 23–29.
31. Каратыгин И.В. Козволюция грибов и растений. СПб.: Наука, 1993. 119 с.
32. Каширская Н.Н., Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Демкин В.А. Микробная биомасса подкурганных и современных почв степной зоны Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2009. № 5. С. 581–587.
33. Каширская Н.Н., Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Ельцов М.В., Борисов А.В. Изменчивость микробной биомассы в палеопочвах разновозрастных курганов Нижнего Поволжья в связи с динамикой увлаженности климата // Аридные экосистемы. 2016. Т. 22. № 1. С. 20–30.
34. Каширская Н.Н., Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Салманова К.А., Кузнецова Ю.С., Демкин В.А. Биологическая активность современной и погребенной каштановых почв сухих степей // Аридные экосистемы. 2013. Т. 2. № 55. С. 64–72.
35. Каширская Н.Н., Хомутова Т.Э., Дмитриев В.В., Дуда В.И., Сузина Н.Е., Демкин В.А. Морфология клеток и биомасса микроорганизмов подкурганных и современных степных почв Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2010. № 10. С. 1229–123.
36. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: МГУ, 1989. 175 с.
37. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., У. Г. Выделенные из вечной мерзлоты грибы

Penicillium aurantiogriseum DIERCKX 1901 – продуценты дикетопиперазиновых алкалоидов рокефортина и 3, 12-дигидророкефортина // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 4. С. 446–451.

38. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. Гриб *Penicillium citrinum*, выделенный из вечномерзлотных древних отложений, как продуцент эргоалкалоидов и новых хинолиновых алкалоидов хиноцитрининов // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 568–572.

39. Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Озерская С.М. Структура микобиоты многолетней мерзлоты // Микология сегодня. 2011. Т. 2. С. 178–186.

40. Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Баслеров Р.В., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 27–41.

41. 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.

42. Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. № 5. С. 512–528.

43. Лысак Л.В., Лапыгина Е.В., Конова И.А., Звягинцев Д.Г. Численность и таксономический состав ультрамикробактерий в почвах // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. С. 432.

44. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 219–229.

45. Марфенина О.Е., Никитин Д.А., Иванова А.Е. Структура грибной биомассы и разнообразие культивируемых микромицетов в почвах Антарктиды (станции Прогресс и Русская) // Почвоведение. 2016. № 8. С. 991–999.
46. Марфенина О.Е., Сахаров Д.С., Иванова А.Е., В. Р.А. Микологические свойства голоценовых и позднеплейстоценовых палеогоризонтов и фрагментов палеопочв // Почвоведение. 2009. № 4. С. 469–478.
47. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика. М.: ИНМИ РАН, 2010. 48 с.
48. Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Козлова А.Н., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Синтез аутоиндукторов анабиоза у неспорообразующих бактерий как механизм регуляции их активности в почве и подпочвенных осадочных породах // Микробиология. 2001. № 70. С. 620–628.
49. Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 645–659.
50. Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. № 1. С. 15–27.
51. Мулюкин А.Л., Филиппова С.Н., Козлова А.Н., Сургучева Н.А., Богданова Т.И., Цаплина И.А., Эль-Регистан Г.И. Видонеспецифичность действия низкомолекулярных ауторегуляторов - неацилированного лактона гомосерина и гексилрезорцина - на рост и развитие бактерий // Микробиология. 2006. № 75. С. 472–482.
52. Мулюкин А.Л., Стражевская Н.Б., Шмырина А.С., Жданов Р.И., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Влияние микробных аутоиндукторов анабиоза - алкилоксибензолов - на структурную организацию ДНК *P. aurantiaca* и индукцию фенотипической диссоциации // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 157–165.

53. Новотоцкая-Власова К.А., Петровская Л.Е., Ривкина Е.М., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Характеристика холодоактивной липазы *Psychrobacter cryohalolentis* K5 T и ее делеционных мутантов // Биохимия. 2013. Т. 78. № 4. С. 501–512.
54. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 309–327.
55. Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н. Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах с использованием метода FISH // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 831–837.
56. Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П., Стоянова Л.Г. Роль некультивируемых форм неспорообразующих бактерий в поддержании гомеостаза популяции // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 4. С. 57–66.
57. Петровская Л.Е., Новотоцкая-Власова, К.А., Спирина Е.В., Хохлова Г.В., Ривкина Е.М., Гиличинский Д.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Липолитические ферменты микроорганизмов из криопэггов вечной мерзлоты // Доклады Академии наук. 2012. Т. 445. № 1. С. 102–105.
58. Полянская Л.М. Микробная сукцессия в почве: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: МГУ, 1996. - 96 с.
59. Пушкарева В.И. Экспериментальная оценка взаимодействий *Yersinia pestis* EV с почвенными инфузориями и возможности длительного сохранения бактерий в цистах простейших // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2004. № 4. С. 40–44.
60. Ривкина Е.М., Лауринавичюс К.С., Гиличинский Д.А., Щербакова В.А. Метанобразование в вечномерзлых отложениях // Доклады РАН. 2002. Т. 383. С. 830–833.
61. Светличный В.А., Савельева Н.Д., Некрасова В.К., Эль-Регистан Г.И., Романова А.К. Органотрофный рост и синтез ауторегуляторного фактора у *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. 1982. № 51. С. 606–610.

62. Светличный В.А., Эль-Регистан Г.И., Романова А.К., Дуда В.И. Характеристика ауторегуляторного фактора d2 вызывающего автолиз клеток *Pseudomonas carboxydoflava* и *Bacillus cereus* // Микробиология. 1983. № 52. С. 33–38.
63. Солохина Л.В., Пушкарева В.И., Литвин В.Ю. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зеленых водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001. № 3. С. 17–22.
64. Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г. И., Головлева Л.А. Влияние состояния покоя на штамм *Pseudomonas fluorescens* 26К - деструктор ксенобиотиков // Микробиология. 2013. Т. 82. № 5. С. 552.
65. Степаненко И.Ю., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. Роль алкилоксибензолов в адаптации *Micrococcus luteus* к температурному шоку // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 26–33.
66. Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Шорохова А.П., Дмитриев В.С., Горленко М.В., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Тонкая структура мумифицированных клеток микроорганизмов, образующихся под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 776–787.
67. Таргульян В.О., Горячкин С.В. Память почв: Почва как память биосферно-геосферно-антропосферных взаимодействий. М.: Издательство ЛКИ, 2008. 692 с.
68. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Алферова И.В., Преображенская Т.П. Использование селективных сред для выделения актиномицетов // Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. Алма-Ата: Гылым, 1990. С. 5–12.
69. Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24.

70. Фомичева Г.М., Василенко О.В., Марфенина О.Е. Сравнительные морфологические, экологические и молекулярные исследования штаммов *Aspergillus versicolor* (vuill.) Tiraboschi, выделенных из разных местообитаний // Микробиология. 2006. Т. 75. № 2. С. 228–234.
71. Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Голод Н.А., Милько Е.С., Воейкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у *Bacillus licheniformis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. Т. 75. № 6. С. 9–13.
72. Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Демкин В.А. Оценка суммарной и активной микробной биомассы разновозрастных подкурганных палеопочв // Микробиология. 2004. Т. 73. № 2. С. 241–247.
73. Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Каширская Н.Н., Демкин В.А. Фосфатазная активность современных и погребенных каштановых почв Волго-Донского мждуречья // Почвоведение. 2012. № 4. С. 478–483.
74. Хомутова Т.Э., Каширская Н.Н., Демкин В.А.. Оценка живой и суммарной биомассы микробных сообществ современной каштановой почвы и подкурганных палеопочв // Почвоведение. 2011. № 12. С. 1496–1503.
75. Чернов Т.И. Метагеномный анализ прокариотных сообществ профилей почв европейской части России: Дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 2016. - 111 с.
76. Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Иванова Е.А., Кутовая О.В., Турусов В.И. Сезонная динамика почвенного микробиома многолетнего агрохимического опыта на черноземах Каменной Степи // Почвоведение. 2015. № 12. С. 1483–1488.
77. Эль-Регистан Г.И. Покой как форма адаптации микроорганизмов // Механизмы выживания бактерий / под ред. О.В. Бухарина и др. М.: Медицина, 2005. С. 11–142.
78. Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И., Козлова А.Н., Митюшина Л.Л., Поплаухина О.Г. Изменение конструктивного метаболизма и ультраструктурной организации клеток *Bacillus cereus* под влиянием специфического ауторегуляторного фактора // Микробиология. 1979. № 48. С. 240–244.

79. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.
80. Ярославцев А.М. Влажность как экологический фактор формирования почвенного гидролитического микробного комплекса: Дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 2010. - 120 с.
81. Abraham W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H., Timmis K.N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. № 3. P. 246–53.
82. Abyzov S.S. Microorganisms in Antarctic ice // Antarctic Microbiology / Eds. E.I. Friedmann. : Princeton University Press, 1993. P. 265–295.
83. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides // Nature. 2011a. V. 473. № 7346. P. 216–20.
84. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them // Curr. Opin. Microbiol. 2011b. V. 14. № 5. P. 593–8.
85. Amann R., Ludwig W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 5. P. 555–65.
86. Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 2. P. 762–70.
87. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. № 1. P. 143–69.
88. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance // Austral Ecol. 2001. V. 26. № 2001. P. 32–46.
89. Angel R., Claus P., Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions // ISME J. 2012. V. 6. № 4. P. 847–62.

90. Arp D.J., Stein L.Y. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2003. V. 38. № 6. P. 471–95.
91. Asakura H., Kawamoto K., Haishima Y., Igimi S., Yamamoto S., Makino S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state // *Res. Microbiol.* 2008. V. 159. № 9–10. P. 709–17.
92. Aslam Z., Yasir M., Khaliq A., Matsui K., Chung Y.R. Too much bacteria still unculturable // *Crop Environ.* 2010. V. 1. № 1. P. 59–60.
93. Attack J.M., Kelly D.J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation // *Future Microbiol.* 2009. V. 4. № 6. P. 677–90.
94. Balkwill D.L., Murphy E.M., Fair D.M., Ringelberg D.B., White D.C. Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the vadose zone // *Microb. Ecol.* 1998. № 35. P. 156–171.
95. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / Eds J.A. Holt et al. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 787 p.
96. Bergmann G.T., Bates S.T., Eilers K.G., Lauber C.L., Caporaso G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities // *Soil Biol Biochem.* 2011. V. 43. № 7. P. 1450–1455.
97. Bertaux J., Gloger U., Schmid M., Hartmann A., Scheu S. Routine fluorescence in situ hybridization in soil // *J. Microbiol. Methods.* 2007. V. 69. № 3. P. 451–60.
98. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin - by intermittent sterilisation // *Lancet.* 1944. V. 244. № 6320. P. 497–500.
99. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 179–194.
100. Bogosian G., Aardema N.D., Bourneuf E. V., Morris P.J., O'Neil J.P. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 18. P. 5070–5.

101. Bray J.R., Curtis J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin // *Ecol. Monogr.* 1957. V. 27. № 4. P. 325–349.
102. Brockman F.J., Kieft T.L., Fredrickson J.K., Bjornstad B.N., Li S. mei W., Spangenburg W., Long P.E. Microbiology of vadose zone paleosols in south-central Washington State // *Microb. Ecol.* 1992. V. 23. № 3. P. 279–301.
103. Bronger A. Correlation of loess-paleosol sequences in East and Central Asia with SE Europe: towards a continental Quaternary pedostratigraphy and paleoclimatic history // *Quat. Int.* 2003. V. 106–107. P. 11–32.
104. Campbell S.E. Soil stabilization by a prokaryotic desert crust: implications for Precambrian land biota // *Orig. Life.* 1979. № 9. P. 335–348.
105. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 5. P. 335–6.
106. Chen H., Fu L., Luo L., Lu J., White W.L., Hu Z. Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom // *Microb. Ecol.* 2012. V. 63. № 1. P. 64–73.
107. Chin K.J., Liesack W., Janssen P.H. *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division «*Verrucomicrobia*» isolated from rice paddy soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. № 6. P. 1965–8.
108. Chong T.H., Wong F.S., Fane A.G. The effect of imposed flux on biofouling in reverse osmosis: Role of concentration polarisation and biofilm enhanced osmotic pressure phenomena // *J. Memb. Sci.* 2008. V. 325. № 2. P. 840–850.
109. Costerton J.W. Introduction to biofilm // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1999. V. 11. № 3–4. P. 217–21.
110. Daniel R. The metagenomics of soil // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. № 6. P. 470–478.

111. Database resources of the National Center for Biotechnology Information // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № D1. P. D8–D20.
112. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. № 4. P. 641–96.
113. DeBruyn J.M., Nixon L.T., Fawaz M.N., Johnson A.M., Radosevich M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 17. P. 6295–6300.
114. Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S., Liesack W. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic sphagnum peat bog // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 3. P. 2110–7.
115. Demkina E., Mulyukin A., Kozlova A., Zolotareva B., El-Registan G. Response of amylase activity in buried paleosols and subsoil permafrost to low-molecular-weight compounds // *Eur. J. Soil Biol.* 2015. V. 70. P. 31–37.
116. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 7. P. 5069–72.
117. Ding L., Yokota A. *Curvibacter fontana* sp. nov., a microaerobic bacteria isolated from well water // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2010. V. 56. № 3. P. 267–71.
118. Divol B., Toit M., Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 95. № 3. P. 601–13.
119. Dworkin J., Shah I.M. Exit from dormancy in microbial organisms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. № 12. P. 890–6.
120. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 19. P. 2460–1.
121. Eickhorst T., Tippkötter R. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH) // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. № 7. P. 1883–1891.

122. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Y.A., Stepanenko I.Y., Kozlova A.N., Martirosova E.I., Shanenko E.F., Strakhovskaya M.G., Revina A.A. The role of microbial low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance of microorganisms to radiation and heat shock // *Adv. Sp. Res.* 2005. V. 36. № 9. P. 1718–1728.
123. Emerson J.B., Thomas B.C., Alvarez W., Banfield J.F. Metagenomic analysis of a high carbon dioxide subsurface microbial community populated by chemolithoautotrophs and bacteria and archaea from candidate phyla // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. № 6. P. 1686–703.
124. Faith D.P., Baker A.M. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges // *Evol. Bioinform. Online.* 2006. V. 2. P. 121–128.
125. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap // *Evolution* (N. Y). 1985. V. 39. № 4. P. 783.
126. Fredrickson J.K., McKinley J.P., Bjornstad B.N., Long P.E., Ringelberg D.B., White D.C., Krumholz L.R., Suflita J.M., Colwell F.S., Lehman R.M., Phelps T.J. Pore-size constraints on the activity and survival of subsurface bacteria in a late Cretaceous shale-sandstone sequence, northwestern New Mexico // *Geomicrobiol. J.* 1997. № 14. P. 183–202.
127. Fredrickson J.K., McKinley J.P., Nierzwicki-Bauer S.A., White D.C., Ringelberg D.B., Rawson S.A., Li S.-M., Brockman F.J., Bjornstad B.N. Microbial community structure and biogeochemistry of miocene subsurface sediments: Implications for long-term microbial survival // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. № 5. P. 619–626.
128. Ghaemmighami S., Huh W.-K., Bower K., Howson R.W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E.K., Weissman J.S. Global analysis of protein expression in yeast // *Nature.* 2003. V. 425. № 6959. P. 737–41.
129. Gilichinsky D.A. Permafrost as a microbial habitat // *Encyclopedia of environmental microbiology* / Eds. G. Bitton. : Willey, 2002. P. 932–956.

130. Gilichinsky D.A., Wagener S., Vishnevetskaya T.A. Permafrost microbiology // *Permafr. Periglac. Process.* 1995. V. 6. № 4. P. 281–291.
131. 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.
132. Ginige M.P., Hugenholtz P., Daims H., Wagner M., Keller J., Blackall L.L. Use of stable-isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization-microautoradiography to study a methanol-fed denitrifying microbial community // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. № 1. P. 588–96.
133. González M., Hänninen M.-L. Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of *Campylobacter jejuni* in well water: application of the Weibull model // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 113. № 2. P. 284–93.
134. Hamblin M.R., Viveiros J., Yang C., Ahmadi A., Ganz R.A., Tolkoff M.J. *Helicobacter pylori* accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 7. P. 2822–7.
135. Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 5. P. 1620–33.
136. Hider R.C., Kong X. Chemistry and biology of siderophores // *Nat. Prod. Rep.* 2010. V. 27. № 5. P. 637–57.
137. Hiraishi A., Ueda Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. V. 44. P. 665–673.
138. Holland S.L., Reader T., Dyer P.S., Avery S. V. Phenotypic heterogeneity is a selected trait in natural yeast populations subject to environmental stress // *Environ. Microbiol.* 2014. V. 16. № 6. P. 1729–1740.

139. Hultman J., Waldrop M.P., Mackelprang R., David M.M., McFarland J., Blazewicz S.J., Harden J., Turetsky M.R., McGuire A.D., Shah M.B., VerBerkmoes N.C., Lee L.H., Mavrommatis K., Jansson J.K. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes // *Nature*. 2015. V. 521. P. 208–212.
140. Itvaara M., Salavirta H., Marjamaa K., Ruskeeniemi T. Geomicrobiology and metagenomics of terrestrial deep subsurface microbiomes // *Adv. Appl. Microbiol.* 2016. V. 94. P. 1–77.
141. Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. Fungi in ancient permafrost sediments of the Arctic and Antarctic regions // *Life in Ancient ice. : Princeton: Princeton Press*, 2005. P. 127–139.
142. Janssen P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 3. P. 1719–28.
143. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. Database issue. P. 109–14.
144. Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormancy in non-sporulating bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 1993. V. 10. № 3–4. P. 271–85.
145. Kaprelyants A.S., Mukamolova G. V., Davey H.M., Kell D.B. Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 4. P. 1311–6.
146. Keep N.H., Ward J.M., Cohen-Gonsaud M., Henderson B. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states // *Trends Microbiol.* 2006. V. 14. № 6. P. 271–276.
147. Kell D., Potgieter M., Pretorius E. Individuality, phenotypic differentiation, dormancy and «persistence» in culturable bacterial systems: commonalities shared by environmental, laboratory, and clinical microbiology // *F1000Research*. 2015. V. 4. № 179. P. 1–51.

148. Kell D.B. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases // BMC Med. Genomics. 2009. V. 2. P. 2.
149. Kell D.B. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples // Arch. Toxicol. 2010. V. 84. № 11. P. 825–89.
150. Kieft T.L., Fredrickson J.K., McKinley J.P., Bjornstad B.N., Rawson S.A., Phelps T.J., Brockman F.J., Pfiffner S.M. Microbiological comparisons within and across contiguous lacustrine, paleosol, and fluvial subsurface sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 2. P. 749–757.
151. Kieft T.L., Murphy E.M., Haldeman D.L., Amy P.S., Bjornstad B.N., McDonald E.V., Ringelberg D.B., White D.C., Stair J., Griffiths R.P., Gsell T.C., Holben W.E., Boone D.R. Microbial transport, survival, and succession in a sequence of buried sediments // Microb. Ecol. 1998. № 36. P. 336–348.
152. Kieft T.L., Wilch E., Connor K.O., Ringelberg D.B. Survival and phospholipid Fatty Acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 4. P. 1531–1542.
153. Kirchman D.L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 39. № 2. P. 91–100.
154. Krivushin K., Kondrashov F., Shmakova L., Tutukina M., Petrovskaya L., Rivkina E. Two metagenomes from late Pleistocene Northeast Siberian permafrost // Genome Announc. 2015. V. 3. № 1. P. e01380-14.
155. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–4.
156. Labonté J.M., Field E.K., Lau M., Chivian D., Heerden E. Van, Wommack K.E., Kieft T.L., Onstott T.C., Stepanauskas R. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface *Firmicutes* population // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 349.

157. Langille M., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J., Burkepile D., Vega Thurber R., Knight R., Beiko R., Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. № 9. P. 814–21.
158. Long P.E., Williams K.H., Hubbard S.S., Banfield J.F. Microbial Metagenomics reveals climate-relevant subsurface biogeochemical processes // Trends Microbiol. 2016. V. 24. № 8. P. 600–610.
159. Lothigius A., Sjöling A., Svennerholm A.-M., Bölin I. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. № 4. P. 1441–9.
160. Luna G.M., Dell’Anno A., Pietrangeli B., Danovaro R. A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments // J. Biotechnol. 2012. V. 157. № 4. P. 446–53.
161. Luria S.E., Latarjet R. Ultraviolet irradiation of bacteriophage during intracellular growth // J. Bacteriol. 1947. V. 53. № 2. P. 149–63.
162. Mackelprang R., Waldrop M.P., DeAngelis K.M., David M.M., Chavarria K.L., Blazewicz S.J., Rubin E.M., Jansson J.K. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw // Nature. 2011. V. 480. № 7377. P. 368–71.
163. Manucharova N.A., Kol’tsova E.M., Stepanov A.L., Demkina E. V., Demkin V.A., El’-Registan G.I. Comparative analysis of the functional activity and composition of hydrolytic microbial complexes from the lower Volga barrow and modern chestnut soils // Microbiology. 2014. V. 83. № 5. P. 674–683.
164. Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K.H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment // Microbiology. 1996. V. 142. P. 1097–106.
165. Markowitz V.M., Chen I.-M.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Grechkin Y., Ratner A., Jacob B., Huang J., Williams P., Huntemann M., Anderson I., Mavromatis K., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. IMG: the Integrated Microbial Genomes

database and comparative analysis system // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. D115-22.

166. McIlroy S.J., Nielsen P.H. The Prokaryotes / Eds E. Rosenberg et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. 863-889 P.

167. Mizunoe Y., Wai S.N., Takade A., Yoshida S. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds // Arch. Microbiol. 1999. V. 172. № 1. P. 63–7.

168. Mockaitis K., Estelle M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2008. V. 24. P. 55–80.

169. Morita R.Y. Psychrophilic bacteria // Bacteriol Rev. 1975. V. 39. № 2. P. 144–67.

170. Mukamolova G. V, Murzin A.G., Salina E.G., Demina G.R., Kell D.B., Kaprelyants A.S., Young M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation // Mol. Microbiol. 2006. V. 59. № 1. P. 84–98.

171. Murphy E.M., Schramke J.A., Fredrickson J.K., Bledsoe H.W., Francis A.J., Sklarew D.S., Linehan J.C. The influence of microbial activity and sedimentary organic carbon on the isotope geochemistry of the Middendorf aquifer // Water Resour Res. 1992. № 28. P. 723–740.

172. Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes // Microbiology. 1998. V. 144. P. 3257–66.

173. Nichols D., Lewis K., Orjala J., Mo S., Ortenberg R., O'Connor P., Zhao C., Vouros P., Kaeberlein T., Epstein S.S. Short peptide induces an «uncultivable» microorganism to grow *in vitro* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 15. P. 4889–97.

174. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Kaprel'iantz A.S. Effect of secreted Rpf protein on intercellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures // Mikrobiologiya. V. 80. № 2. P. 155–61.

175. O'Sullivan L.A., Weightman A.J., Fry J.C. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 1. P. 201–10.
176. Osburn M.R., LaRowe D.E., Momper L.M., Amend J.P. Chemolithotrophy in the continental deep subsurface: Sanford Underground Research Facility (SURF), USA. // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 610.
177. Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. № 4. P. 992–999.
178. Panutdaporn N., Kawamoto K., Asakura H., Makino S.-I. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2 // Int. J. Food Microbiol. 2006. V. 106. № 3. P. 241–7.
179. Pinto D., Almeida V., Almeida Santos M., Chambel L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 110. № 6. P. 1601–11.
180. Podar M., Abulencia C.B., Walcher M., Hutchison D., Zengler K., Garcia J.A., Holland T., Cotton D., Hauser L., Keller M. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 10. P. 3205–14.
181. Pourcher, Sutra, Hébé, Moguedet, Bollet, Simoneau, Gardan. Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill // FEMS Microbiol. Ecol. 2001. V. 34. № 3. P. 229–241.
182. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for large alignments // PLoS One. 2010. V. 5. № 3. P. e9490.
183. Prosser J.I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of «omics» in soil microbial ecology // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13. № 7. P. 439–46.

184. Purkamo L., Bomberg M., Kietäväinen R., Salavirta H., Nyysönen M., Nuppenen-Puputti M., Ahonen L., Kukkonen I., Itävaara M. The keystone species of Precambrian deep bedrock biosphere belong to *Burkholderiales* and *Clostridiales* // Biogeosciences Discuss. 2015a. V. 12. № 21. P. 18103–18150.
185. Purkamo L., Bomberg M., Nyysönen M., Kukkonen I., Ahonen L., Itävaara M. Heterotrophic communities supplied by ancient organic carbon predominate in deep Fennoscandian bedrock fluids // Microb. Ecol. 2015b. V. 69. № 2. P. 319–332.
186. Puspita I.D., Uehara M., Katayama T., Kikuchi Y., Kitagawa W., Kamagata Y., Asano K., Nakatsu C.H., Tanaka M. Resuscitation Promoting Factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821T promotes growth and resuscitates non-dividing cells // Microbes Environ. 2013. V. 28. № 1. P. 58–64.
187. Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of *Proteobacteria* // Environ. Microbiol. 1999. V. 1. № 2. P. 145–57.
188. Raser J.M., O'Shea E.K. Noise in gene expression: Origins, Consequences, and Control // Science. 2005. V. 309. № 5743. P. 2010–2013.
189. Reed D.C., Breier J.A., Jiang H., Anantharaman K., Klausmeier C.A., Toner B.M., Hancock C., Speer K., Thurnherr A.M., Dick G.J. Predicting the response of the deep-ocean microbiome to geochemical perturbations by hydrothermal vents // ISME J. 2015. V. 9. № 8. P. 1857–69.
190. Retallack G. Soils of the past. An introduction to Paleopedology: Blackwell Science, 2001. 404 p.
191. Reuter M., Mallett A., Pearson B.M., van Vliet A.H.M. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 7. P. 2122–8.
192. Rezaeinejad S., Ivanov V. Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation // Microbiol. Res. 2011. V. 166. № 2. P. 129–35.

193. 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.
194. Rivkina E.M., Friedmann E.I., McKay C.P., Gilichinsky D.A. Metabolic activity of Permafrost Bacteria below the freezing point // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 8. P. 3230–3233.
195. Rivkina E.M., Gilichinsky D.A., Laurinavichyus K.S., Shcherbakova V.A., McGrath J., Tiedje J.M. Microbial life in permafrost // Adv. Sp. Res. 2004. V. 33. № 8. P. 1215–1221.
196. Rondon M.R., Goodman R.M., Handelsman J. The Earth's bounty: Assessing and accessing soil microbial diversity // Trends Biotechnol. 1999. V. 17. № 10. P. 403–409.
197. Roszak D.B., Colwell R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment // Microbiol. Rev. 1987. V. 51. № 3. P. 365–79.
198. Roux S., Hawley A.K., Torres Beltran M., Scofield M., Schwientek P., Stepanauskas R., Woyke T., Hallam S.J., Sullivan M.B. Ecology and evolution of viruses infecting uncultivated SUP05 bacteria as revealed by single-cell- and meta-genomics // Elife. 2014. V. 3. P. e03125.
199. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 4. P. 406–25.
200. Sangwan P., Chen X., Hugenholtz P., Janssen P.H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria classis* nov., of the phylum *Verrucomicrobia* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 10. P. 5875–81.
201. Shah D., Zhang Z., Khodursky A., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 53.
202. Sohlberg E., Bomberg M., Miettinen H., Nyssanen M., Salavirta H., Vikman M., Itavaara M. Revealing the unexplored fungal communities in deep

groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 573

203. Soina V.S., Mulyukin A.L., Demkina E. V, Vorobyova E.A., El-Registan G.I. The structure of resting bacterial populations in soil and subsoil permafrost // Astrobiology. 2004. V. 4. № 3. P. 345–358.

204. Somanadhan B., Kotturi S.R., Yan Leong C., Glover R.P., Huang Y., Flotow H., Buss A.D., Lear M.J., Butler M.S. Isolation and synthesis of falcitidin, a novel myxobacterial-derived acyltetrapeptide with activity against the malaria target falcipain-2 // J. Antibiot. (Tokyo). 2013. V. 66. № 5. P. 259–64.

205. 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 Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 2. P. 513–523.

206. Stevens T.O., Holbert B.S. Variability and density dependence of bacteria in terrestrial subsurface samples: implications for enumeration // J. Microbiol. Methods. 1995. V. 21. № 3. P. 283–292.

207. Stevenson B.S., Eichorst S.A., Wertz J.T., Schmidt T.M., Breznak J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 8. P. 4748–55.

208. Su X., Chen X., Hu J., Shen C., Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. № 12. P. 2213–2218.

209. Su X., Shen X., Ding L., Yokota A. Study on the flocculability of the *Arthrobacter sp.*, an actinomycete resuscitated from the VBNC state // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. № 1. P. 91–7.

210. Suzina N.E., Mulyukin A.L., Dmitriev V. V., Nikolaev Y.A., Shorokhova A.P., Bobkova Y.S., Barinova E.S., Plakunov V.K., El-Registan G.I., Duda V.I. The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria // Adv. Sp. Res. 2006. V. 38. № 6. P. 1209–1219.

211. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. V. 101. № 30. P. 11030–5.
212. Torsvik V., Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. № 3. P. 240–5.
213. Trevors J.T. One gram of soil: a microbial biochemical gene library // Antonie Van Leeuwenhoek. 2010. V. 97. № 2. P. 99–106.
214. Trevors J.T., Bej A.K., Mojib N., van Elsas J.D., van Overbeek L. Bacterial gene expression at low temperatures // Extremophiles. 2012. V. 16. № 2. P. 167–76.
215. Vishnivetskaya T.A., Kathariou S., McGrath J., Tiedje J.M., Gilichinsky D.A. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments // Extremophiles. 2000. V. 4. № 3. P. 165–173.
216. Vishnivetskaya T., Erokhina L., Spirina E., Shatilovich A., Vorobyova E., Gilichinsky D. Ancient viable green algae and cyanobacteria from permafrost // Algae and extreme environments. : Nova Hedwigia Beihefte, 2001. P. 427–441.
217. Vorobyova E.A., Soina V.S., Gorlenko M., Minkovskaya N., Zalinova N., Mamukelashvili A., Gilichinsky D., Rivkina E., Vishnivetskaya T. The deep cold biosphere: Facts and hypothesis // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 20. № 3–4. P. 277–290.
218. Vorobyova E.A., Soina V.S., Mulukin A.L. Microorganisms and enzyme activity in permafrost after removal of long-term cold stress // Adv. Sp. Res. 1996. V. 18. № 12. P. 103–108.
219. Vulic M., Kolter R. Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cultures // Genetics. 2001. V. 158. № 2. P. 519–26.
220. Wagner M., Horn M., Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes // Curr. Opin. Microbiol. 2003. V. 6. № 3. P. 302–9.
221. Walter K.M., Zimov S.A., Chanton J.P., Verbyla D., Chapin III F.S. Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming // Nature. 2006. V. 443. P. 71–75.

222. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.
223. Whitesides M.D., Oliver J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 3. P. 1002–5.
224. Will C., Thürmer A., Wollherr A., Nacke H., Herold N., Schrumpf M., Gutknecht J., Wubet T., Buscot F., Daniel R. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 20. P. 6751–9.
225. Yamada K.D., Tomii K., Katoh K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data-reexamination of the usefulness of chained guide trees. // Bioinformatics. 2016. V. 32. № 21. P. 3246–3251.
226. Yergeau E., Bokhorst S., Kang S., Zhou J., Greer C.W., Aerts R., Kowalchuk G.A. Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments // ISME J. 2012. V. 6. № 3. P. 692–702.
227. 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 // ISME J. 2010. V. 4. № 9. P. 1206–14.
228. Zhang D.-C., Mörtelmaier C., Margesin R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil // Sci. Total Environ. 2012. V. 421–422. P. 184–96.