

РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ В ОБРАЗЦАХ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОСТРОВА ЗАПАДНЫЙ ШПИЦБЕРГЕН

В.Э. Трубицын¹, Я.В. Рыжманова¹, А.Г. Захарюк¹, В.И. Ошуркова¹, К.С. Лауринавичюс¹,
Е.В. Спирина², В.А. Щербак ова¹, Е.М. Ривкина²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН, 142290, Пушкино, Московская обл., пр. Науки, 5, Россия; lichoradkin43@gmail.com

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 2, Россия

Получены данные о разнообразии анаэробных и аэробных прокариот в образцах, отобранных на глубине от 0.5 до 3.7 м скважин в многолетнемерзлых отложениях в экспедиции Государственного научного центра “Арктический и Антарктический научно-исследовательский институт” в 2016 г. Определена численность органотрофных микроорганизмов, которая для аэробов варьировала от $3.29 \cdot 10$ до $7.0 \cdot 10^4$ КОЕ/г, для анаэробов – от $3.0 \cdot 10$ до $2.3 \cdot 10^4$ кл/г. В отдельных пробах при анаэробном культивировании наблюдалось образование метана и ацетата, тогда как сульфат- и железовосстанавливающие прокариоты не были обнаружены ни в одной из проб. В процессе исследований было выделено 60 штаммов аэробных психрофильных и психротолерантных бактерий. Таксономическое положение выделенных микроорганизмов установлено путем секвенирования генов 16S рРНК и с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Созданная коллекция штаммов состояла из представителей филумов *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*.

Многолетнемерзлые отложения, Западный Шпицберген, микробные сообщества, психрофильные микроорганизмы, анаэробные прокариоты

DIVERSITY OF CULTURED PROKARYOTES IN PERMAFROST SEDIMENT SAMPLES OF WEST SPITSBERGEN ISLAND

V.E. Trubitsyn¹, Y.V. Rhyzhmanova¹, A.G. Zaharuk¹, V.I. Oshurkova¹, K.S. Laurinavichius¹,
E.V. Spirina², V.A. Shcherbakova¹, E.M. Rivkina²

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, 5, prosp. Nauki, Moscow region, Pushchino, 142290, Russia; lichoradkin43@gmail.com

²Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, RAS, 2, Institutskaya str., Moscow region, Pushchino, 142290, Russia

The diversity of anaerobic and aerobic microorganisms (prokaryotes) was studied in permafrost soil sampled at a depth of 0.5 to 3.7 m during the 2016 expedition of the State Scientific Centre of the Russian Federation the Arctic and Antarctic Research Institute (AARI). The estimated number of organotrophic microorganisms varies from $3.29 \cdot 10$ to $7.0 \cdot 10^4$ CFU \cdot g⁻¹ for aerobic, and from $3.0 \cdot 10$ to $2.3 \cdot 10^4$ cell \cdot g⁻¹ for anaerobic organisms. In separate anaerobically cultivated samples, methane and acetate were observed, while sulfate and iron reducing prokaryotes were detected in none of the samples. In the course of research, 60 strains of aerobic psychrophilic and psychrotolerant bacteria were isolated. The taxonomic position of the isolated microorganisms was established by sequencing the 16S rRNA genes and using MALDI mass spectrometry. The created collection of strains consisted of representatives of the *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Betaproteobacteria* and *Gammaaproteobacteria* phyla.

Permafrost sediments, West Spitsbergen, microbial communities, psychrophilic microorganisms, anaerobic prokaryotes

ВВЕДЕНИЕ

Низкотемпературные высокоширотные экосистемы и населяющие их микробные сообщества весьма чувствительны к климатическим изменениям, происходящим на Земле. Дисбаланс в трофических связях сообщества может создать условия для увеличения эмиссии парниковых газов, что приведет к ускорению темпов глобального потепления. Результаты исследований последних лет убедительно показали, что микробные сообщества многолетнемерзлых отложений (ММО) об-

ладают большим видовым разнообразием. Из холодных местообитаний выделены новые таксоны бактерий и архей, среди которых *Arthrobacter psychrochitiniphilus* [Wang et al., 2009], *Carnobacterium pleistocenium* [Pikuta et al., 2005], *Clostridium algophilum* [Shcherbakova et al., 2005], *Exiguobacterium sibiricum* [Rodrigues et al., 2006], *Psychrobacter arcticus* [Bakermans et al., 2006], *P. glaciei* [Zeng et al., 2016], *Desulfovibrio arcticus* [Pecheritsyna et al., 2012], *Methanobacterium veterum* [Krivushin et al.,

2010], *M. arcticum* [Shcherbakova et al., 2011] и др. Ранее было показано, что психрофильные микроорганизмы являются источниками психроактивных ферментов, представляющих большой интерес для биотехнологии [Петровская и др., 2012; Marx et al., 2007; Margesin, Feller, 2010; Petrovskaya et al., 2010], в том числе определены гены ферментов, связанных с синтезом антибиотиков и антиоксидантов [Hansen et al., 2007; Yuan et al., 2018].

В ходе предыдущих исследований на Шпицбергене изучались микробиота ледника [Grzesiak et al., 2015], а также микробные сообщества ММО [Hansen et al., 2007; Singh et al., 2017]. Установлено, что в сообществах вечной мерзлоты острова преобладают микроорганизмы филумов *Actinobacteria* (роды *Arthrobacter*, *Cryobacterium* и др.) и *Proteobacteria* (роды *Pseudomonas*, *Psychrobacter* и др.). Минорный компонент микробиоты составляли *Firmicutes* (роды *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Virgibacillus*) и *Bacteroidetes* (роды *Pedobacter*, *Spirosoma*, *Sphingobacterium*). Всего исследователями было выделено 38 представителей этих родов. Из анаэробных процессов был обнаружен только процесс сульфатредукции [Hansen et al., 2007].

Целью настоящей работы было расширить представления о разнообразии культивируемых прокариот в образцах мерзлых грунтов о. Западный Шпицберген вблизи поселка Баренцбург.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район и объекты исследования. Объектами исследования являлись образцы мерзлых отложе-

ний из кернов семи скважин, пробуренных вблизи пос. Баренцбург, от 78°01'48" до 78°06'11" с.ш. и от 14°12'33" до 14°19'25" в.д. (рис. 1).

Отбор проб и хранение образцов. Бурение и отбор образцов производили в 2016 г. сотрудники лаборатории криологии почв Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН в составе экспедиции Государственного научного центра "Арктический и Антарктический научно-исследовательский институт". Для микробиологического исследования были отобраны восемь образцов отложений из семи скважин (табл. 1). В пределах скважин мощность сезонноталого слоя составляла от 1.15 до 2.6 м [Демидов и др., 2016]. Образцы 1 и 2 были отобраны из сезонноталого слоя мерзлоты, образцы 3, 4, 5, 6, 7, 8 – из горизонтов ММО.

Метод стерильного отбора проб ММО с использованием бурового оборудования УКБ-12/25 ранее подробно описан [Гуличинский и др., 1989; Shi et al., 1997]. В лаборатории полученные пробы хранили при –20 °С до начала микробиологических исследований.

Учет численности микроорганизмов. При определении максимального количества аэробных микроорганизмов (для учета колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм почвы) использованы стандартные питательные среды для выделения микроорганизмов из ММО [Vishnivetskaya et al., 2000]: для гетеротрофов – предварительно разбавленный в соотношении 1:2 триптиказо-соевый бульон – TSB (Difco) с добавлением 15 г/л агара

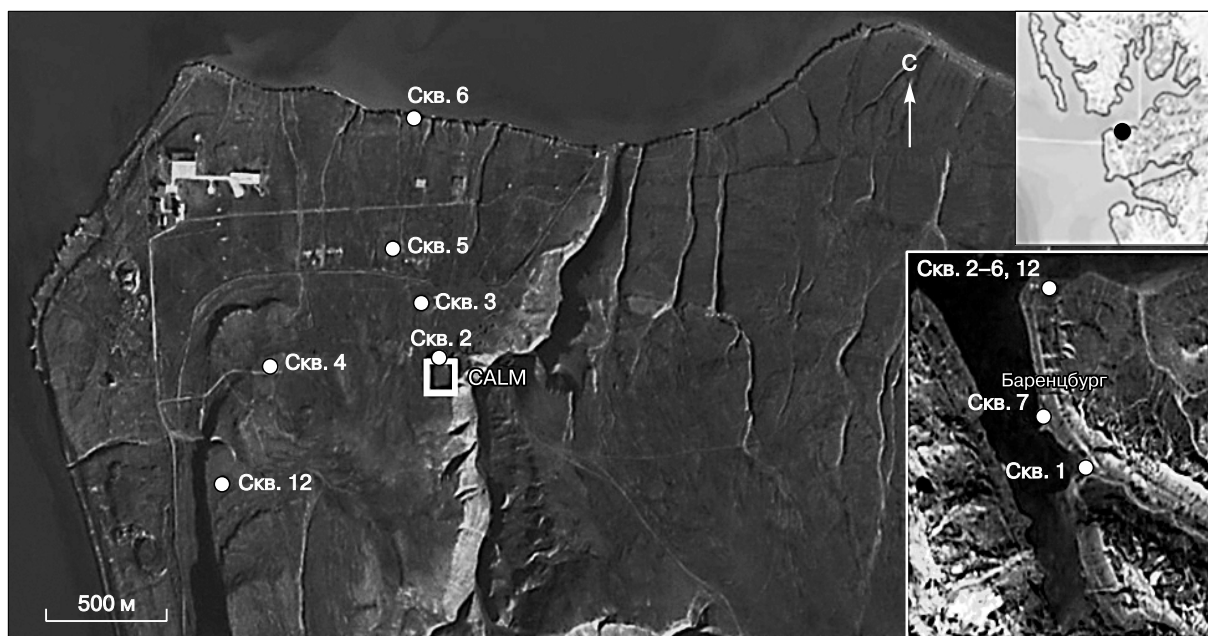


Рис. 1. Расположение точек отбора проб на карте о. Западный Шпицберген (модифицировано по: [Демидов и др., 2016]).

Таблица 1. Характеристика исследованных проб мерзлых отложений

| Номер пробы | Глубина, м | Номер скважины | Описание | Общая минерализация, % от сухой массы | pH | Содержание основных ионов в водной вытяжке, мг/л | | | | |
|-------------|------------|----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----|--|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | | F ⁻ +Cl ⁻ | SO ₄ ²⁻ | Na ⁺ +K ⁺ | Ca ²⁺ +Mg ²⁺ | HCO ₃ ⁻ |
| 1 | 0.5 | 6 | Песок, гравий | 0.024 | 6.4 | 17.0 | 1.0 | 21.3 | 0.7 | 2.1 |
| 2 | 1.25 | 4 | Суглинок с гравийными включениями | 0.025 | 6.8 | 12.3 | 21.2 | 23.1 | 5.0 | 6.8 |
| 3 | 1.5 | 1 | Суглинок с гравием | 0.040 | 7.2 | 16.7 | 24.4 | 31.4 | 3.5 | 8.7 |
| 4 | 1.75 | 2 | Песок, суглинок | 0.007 | 6.7 | 14.7 | 3.2 | 20.0 | 1.1 | 4.1 |
| 5 | 2.2 | 3 | Песок с галечными включениями | 0.014 | 6.7 | 14.6 | 8.2 | 22.3 | 1.6 | 4.9 |
| 6 | 2.9 | 5 | Суглинок | 0.013 | 7.1 | 8.6 | 6.4 | 12.4 | 2.1 | 8.7 |
| 7 | 3.5 | 7 | Песок, галька и гравий | 0.037 | 6.9 | 20.1 | 29.8 | 33.8 | 9.0 | 7.6 |
| 8 | 3.7 | 2 | Глина | 0.287 | 8.2 | 145.9 | 156.6 | 251.6 | 5.0 | 52.7 |

(Difco), для олиготрофов водных и обедненных органическим веществом природных экосистем – R2A (Difco). Культивирование осуществлялось при температурах 7–8 и 20 °С, результаты учитывали на 11-е и 5-е сутки соответственно.

Культивирование анаэробных микроорганизмов производилось по методике Хангейта [Hungate, 1969] при температурах 7–8 и 20 °С. Для определения численности анаэробных прокариот различных физиологических групп использовали метод предельных разведений на жидких питательных средах [Gerhardt et al., 1994] в пробирках Хангейта с объемом среды 10 мл. Численность анаэробных органотрофных бактерий определена на среде следующего состава (г/л): K₂HPO₄ (0.7), KH₂PO₄ (0.7), MgSO₄·7H₂O (0.1), MnSO₄·5H₂O (0.1), NH₄Cl (0.5), Na₂SO₄ (0.1), NaCl (0.9), аскорбиновая кислота (1.0), пептон (2.0), глюкоза (2.5), раствор микроэлементов DSMZ 320 (1.0 мл), pH 7.0. Рост микроорганизмов отслеживали по изменению мутности среды.

Для учета численности и выделения метаногенных архей использована среда DSMZ 141, присутствие метаногенов в посеве устанавливалось по наличию метана в газовой фазе. Численность ацетогенных микроорганизмов определена на среде (г/л): NH₄Cl (0.1), MgCl₂·6H₂O (0.01), CaCl₂ (0.01), K₂HPO₄ (0.04), дрожжевой экстракт (0.01), Tris-HCl (0.3), 2-бромэтансульфоновая кислота BES (0.04), раствор микроэлементов DSMZ 318 (1.0 мл), резазурин (0.2), раствор витаминов DSMZ 141 (10 мл), pH 7.0. В качестве субстрата для роста ацетогенов использовали смесь H₂/CO₂ (4:1). Рост выявляли по накоплению ацетата в среде культивирования.

Для подсчета сульфатовосстанавливающих бактерий (СВБ) была использована среда (г/л): Na₂SO₄ (3.0), KH₂PO₄ (1.0), NH₄Cl (1.0), CaCl₂ (0.1), MgSO₄·7H₂O (0.25), KCl (0.5), дрожжевой экстракт (0.5), раствор микроэлементов DSMZ

141 (2.0 мл), лактат натрия (1.0), pH 7.0. Рост СВБ оценивали по накоплению в среде сульфида.

Модифицированная среда Пфеннига для учета численности железовосстанавливающих бактерий содержала (г/л): KH₂PO₄ (0.33), NH₄Cl (0.33), MgCl₂·6H₂O (0.33), CaCl₂·2H₂O (0.33), раствор микроэлементов (1.0 мл) [Slobodkin, Wiegel, 1997], раствор витаминов (10.0 мл) [Wolin et al., 1963]. В качестве донора электронов и единственного источника углерода использовался ацетат натрия (0.2). В качестве акцепторов электронов вносились (ммоль): цитрат Fe (III) (20.0) и аморфная гидроокись оксидного железа (АГОЖ) (10.0), которую готовили путем титрования 10%-м раствором NaOH (мас./об.) раствора FeCl₃·6H₂O. Наличие железоредукторов в посеве определяли путем измерения концентрации двухвалентного железа в среде культивирования.

Все посеы анаэробов выполнялись в трехкратной повторности, результаты фиксировались через 60 дней.

Получение чистых культур. Чистые культуры органотрофных аэробных микроорганизмов выделялись методом пересевов на плотные питательные среды 1/2 TSA (Difco) и R2A (Difco).

Микроскопические методы. Морфология клеток изучалась с помощью светового микроскопа Axiostar PLUS (CarlZeiss, Германия) с фазовым контрастом при увеличении ×1000.

Аналитические методы исследования. Оптическая плотность среды измерялась на спектрофотометре Spekol 221 (Германия) при длине волны 600 нм. Концентрация ацетата измерялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Knauer (Германия) с колонкой Inertsil ODS-3 (5 мкм, 250 × 4.6 мм; Dr. Maisch GmbHs, Германия) при 210 нм и 35 °С со скоростью потока 1 мл/мин. Подвижная фаза – 20 ммоль раствора ортофосфорной кислоты. Идентификация производилась с использованием стан-

дартных растворов кислот в концентрации 1 г/л (Sigma-Aldrich, США) по временам удержания.

Содержание *метана* в газовой фазе определялось на газовом хроматографе Pye Unicam 304 (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором. Для этого была использована стеклянная колонка (длина 1 м, внутренний диаметр 2 мм), заполненная Порапаком Q, 80–100 меш (Fluka, Германия). Определение *сульфида* осуществляли по стандартному методу Фишера в модификации Кляйна [Cline, 1969]. Восстановление Fe(III) учитывалось колориметрическим методом по образованию стабильного окрашенного комплекса двухвалентного железа с феррозином [Lovley, Philips, 1986].

Масс-спектры поверхностных структур клеток получали на МАЛДИ масс-спектрометре (МС) Autoflex/26e3B (Bruker Daltonics, Германия) с использованием системы обработки данных, включающей программный пакет Compass™. Клетки отделяли от среды центрифугированием, промывали тремя объемами 70%-го этанола и ресуспендировали. Затем этанол удаляли и при тщательном помешивании вносили 50 мкл 70%-го формиата. После этого добавляли 50 мкл ацетонитрила, перемешивали и центрифугировали 2 мин при 13 000 об/мин. Супернатант наносили на мишень МАЛДИ МС, высушивали при комнатной температуре и на него наслаивали 1 мкл заранее приготовленного раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. Выделение и очистка хромосомной ДНК производились по методу Мармура [Marmur, 1961]. Амплификация нуклеотидных фрагментов гена 16S рРНК осуществлялась на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия). Суммарный объем реакционной смеси составлял 25 мкл, в ее состав входили следующие компоненты: 1х буфер для Таq-полимеразы (Силекс, Россия); 10 нг ДНК-матрицы; 50 мкмоль каждого дНТФ (Силекс, Россия); по 0.25 мкмоль праймеров 27f (3'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-5') и 1492r (3'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-5') (Евроген, Россия) [Lane, 1991], 1 ед. Таq-полимеразы (Евроген, Россия). Цикл амплификации состоял из начальной денатурации (95 °С, 3 мин), последующих 29 циклов – денатурации (95 °С, 30 с), отжига праймеров (55 °С, 12 с), элонгации ДНК (72 °С, 1 мин 30 с); конечной элонгации (72 °С, 3 мин). Результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) оценивались с помощью горизонтального гель-электрофореза в 1%-м агарозном геле.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК производилось в Межинститутском центре коллективного пользования

“Геном” ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Анализ продуктов реакции производился на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Филогенетический анализ. Для построения филогенетических деревьев использовалась программа MEGA6 [Tamura et al., 2013] с применением методов Neighbour-Joining, Maximum Likelihood и Minimum Evolution, дающих в этом случае сходную топологию дендрограмм. Полученные последовательности депонированы в GenBank под номерами МК135907–МК135923.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследования существовала необходимость охватить широкий диапазон глубин ММО и все скважины разного геологического строения. Из всех отобранных проб преимущественно было отдано тем, в которых при предварительном анализе был обнаружен метан, что могло свидетельствовать о присутствии в ММО структурированных микробных сообществ с хорошо развитыми трофическими связями.

Численность микроорганизмов. Изучение количественных характеристик распределения аэробных и анаэробных представителей микробных сообществ ММО о. Западный Шпицберген проводили на образцах, указанных в табл. 1.

Численность аэробных микроорганизмов в зависимости от температуры инкубации варьировала в пределах $1.61 \cdot 10^2$ – $7.0 \cdot 10^4$ КОЕ/г при 7–8 °С и $3.29 \cdot 10$ – $4.62 \cdot 10^4$ при 20 °С. Максимальная численность КОЕ/г была выявлена в сезонноталом слое (проба 1) и на глубине 2.9 м (проба 6) и составила $2.89 \cdot 10^4$ и $7.00 \cdot 10^4$ КОЕ/г соответственно (табл. 2). Для проб 4, 5 и 8 рост микроорганизмов в низкотемпературных условиях (7–8 °С) ни на одной из сред не наблюдался, что, возможно, связано с отсутствием доступного органического углерода. Количество анаэробных органотрофных микроорганизмов по данным метода предельных разведений составляло $3.0 \cdot 10$ – $2.3 \cdot 10^4$ кл/г при 7–8 °С и $3.0 \cdot 10$ – $2.5 \cdot 10^3$ кл/г при 20 °С. Максимальная численность зафиксирована в пробе 2 ($2.3 \cdot 10^4$ кл/г), минимальная – в пробе 7 ($3.0 \cdot 10$ кл/г). В пробах 3, 4, 5, 7 и 8 численность органотрофов не зависела от температуры инкубации, однако в пробах сезонноталого слоя (1, 2) и ММО (6) психрофильных микроорганизмов было на порядок больше (см. табл. 2).

Ни в одном из образцов на использованных средах не были обнаружены сульфат- и железовосстанавливающие бактерии. Определение численности метанобразующих архей и ацетогенов показало, что образование метана и ацетата было зафиксировано в разведении $\times 10$ при посеве образца 3. Кроме того, ацетат образовался в таком же

Таблица 2.

**Численность культивируемых прокариот
в исследованных образцах многолетнемерзлых отложений**

| Номер пробы | Культивируемые микроорганизмы | | | | | | | | | |
|-------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|--------|------------|--------|
| | Аэробные органотрофные прокариоты, КОЕ/г | | | | Анаэробные прокариоты*, кл/г | | | | | |
| | R2A | | 1/2 TSA | | Органотрофы | | Ацетогены | | Метаногены | |
| | 7–8 °С | 20 °С | 7–8 °С | 20 °С | 7–8 °С | 20 °С | 7–8 °С | 20 °С | 7–8 °С | 20 °С |
| 1 | 1.2·10 ⁴ | 1.3·10 ⁴ | 1.2·10 ⁴ | 2.9·10 ⁴ | 5.6·10 ² | 5.6·10 | 5.6·10 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 8.4·10 ² | 1.0·10 ³ | 1.5·10 ³ | 9.7·10 ² | 2.3·10 ⁴ | 2.5·10 ³ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1.7·10 ² | 3.9·10 ² | 8.4·10 ² | 8.4·10 ² | 4.9·10 | 4.9·10 | 0 | 4.9·10 | 4.9·10 | 4.9·10 |
| 4 | 0 | 7.4·10 | 0 | 1.5·10 ² | 4.5·10 | 4.5·10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 3.3·10 | 0 | 6.6·10 | 5.0·10 | 5.0·10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 7.0·10 ⁴ | 2.5·10 ⁴ | 7.0·10 ⁴ | 4.6·10 ⁴ | 4.9·10 ³ | 4.9·10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 4.8·10 ² | 1.2·10 ² | 1.6·10 ² | 3.6·10 ² | 3.0·10 | 3.0·10 | 3.0·10 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 5.4·10 ² | 5.3·10 ² | 5.3·10 ² | 5.3·10 ² | 0 | 0 | 0 |

*Сульфат- и Fe(III)-восстанавливающие бактерии ни в одном из образцов не обнаружены.

разведении при посеве проб 1, 7 и 8, несмотря на значительные различия в характеристике этих проб (см. табл. 1). Таким образом, количество ацетогенов и метаногенов не превышало десятков клеток в грамме осадка (см. табл. 2).

Ранее на большой выборке арктических проб было показано, что в погребенных почвах и ММО численность бактерий может колебаться от 10² до 10⁸ кл/г породы, иногда достигая 10⁸ кл/г [Gilichinsky et al., 2008]. Полученные в этой работе данные сопоставимы с результатами предыдущих исследований микробного сообщества ММО о. Западный Шпицберген из сезонноталого слоя [Singh et al., 2017] и верхнего горизонта ММО [Hansen et al., 2007]. Так, в исследовании Сингха с соавт. [Singh et al., 2017] численность культивируемых микроорганизмов не превышала 7.6·10⁴ КОЕ/г. В работе [Hansen et al., 2007] численность анаэробных бактерий определялась в жидкой среде R2A, и полученные значения были на порядок выше определенных нами (7.3·10⁵ кл/г) в образцах из сопоставимых горизонтов.

Как видно из табл. 2, наибольшая численность аэробных микроорганизмов зафиксирована в пробах 1 и 6, анаэробов – в образцах 2 и 6. В пробе 1, отобранной из сезонноталого слоя, количество выросших колоний на чашках было наибольшим при 20 °С, тогда как в пробе 6 из ММО микроорганизмы росли активнее при 7–8 °С. Относительно высокая численность микроорганизмов в сезонноталом слое по сравнению с нижележащими отложениями отмечалась ранее в [Спирина, Федоров-Давыдов, 1998]. Это связано с доступностью органического вещества и активизацией биологической деятельности в летние месяцы.

Получение чистых культур аэробных бактерий. В процессе пересевов на твердую среду было выделено 60 штаммов аэробных психрофильных и

психротолерантных бактерий. На первом этапе исследований полученные культуры были проанализированы методом МАЛДИ МС, что позволило сгруппировать сходные между собой штаммы и выявить бактерии, представляющие собой таксоны (табл. 3). На основании полученных данных штаммы EMg2, EMg3, YMg6, VMg2, VPb1 отнесены к роду *Arthrobacter*, штаммы EMg4, VPb2, AMi3 – к родам *Massilia*, *Agromyces* и *Corynebacterium* соответственно. Поскольку база данных МАЛДИ МС содержала в основном медицинские штаммы, идентификация большей части природных изолятов была невозможна.

Для 17 штаммов были определены последовательности генов 16S рРНК размером от 561 до 1403 п.о. (пар оснований) (табл. 4). Выделенные

Таблица 3. Таксономическое положение выделенных штаммов по данным МАЛДИ масс-спектрометрии

| Номер образца | Температура, °С | Штамм | Ближайший вид (коэффициент подобия*) |
|---------------|-----------------|-------|---|
| 1 | 7–8 | VPb1 | <i>Arthrobacter pascens</i> (1.52) |
| 1 | 7–8 | VPb2 | <i>Agromyces salentinus</i> (1.654) |
| 3 | 20 | PMd1 | <i>Micrococcus luteus</i> (1.628) |
| 6 | 20 | VMg2 | <i>Arthrobacter oxydans</i> (1.678) |
| 6 | 20 | EMg2 | <i>Arthrobacter gangotriensis</i> (1.642) |
| 6 | 20 | EMg3 | <i>Arthrobacter polychromogenes</i> (1.677) |
| 6 | 20 | EMg4 | <i>Massilia timonae</i> (1.626) |
| 6 | 20 | YMg6 | <i>Arthrobacter sulfonivorans</i> (1.716) |
| 8 | 7–8 | DPi1 | <i>A. sulfonivorans</i> (1.646) |
| 8 | 20 | AMi3 | <i>Corynebacterium falsenii</i> (1.616) |

*Значение коэффициента подобия более 1.5 свидетельствует о том, что штамм относится к данному роду, более 2.0 – к данному виду.

Таблица 4. Таксономическое положение выделенных аэробных микроорганизмов по результатам секвенирования последовательностей гена 16S рРНК

| Номер образца | Штамм | Длина фрагмента, п.о. | Ближайший культивируемый вид (номер в GenBank) | Сходство, % |
|---------------|-------|-----------------------|--|-------------|
| 1 | FPh4 | 689 | <i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 ^T (AB279889) | 99.3 |
| 1 | OMh2 | 1140 | <i>Sporosarcina globispora</i> 785 ^T (X68415) | 98.5 |
| 2 | APf1 | 561 | <i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3 ^T (AB588633) | 99.3 |
| 2 | LPf1 | 1317 | <i>Fronidhabitans australicus</i> E1HC-02 ^T (FM998017) | 99.1 |
| 3 | CMb6 | 1403 | <i>Cryobacterium arcticum</i> SK1 ^T (GQ406814) | 98.7 |
| 3 | CMb7 | 848 | <i>Cryobacterium psychrotolerans</i> 0549 ^T (DQ515963) | 99.8 |
| 3 | PMd1 | 660 | <i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238 ^T (EU005372) | 98.5 |
| 3 | UMb2 | 1359 | <i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 ^T (AB279889) | 98.7 |
| 6 | BMg1 | 1397 | <i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 483 ^T (AJ312213) | 99.3 |
| 6 | GPg2 | 845 | <i>Bacillus albus</i> N35-10-2 ^T (KJ812440) | 99.6 |
| 6 | GPg3 | 934 | <i>Psychrobacter glaciei</i> B1c20019 ^T (FJ748508) | 99.7 |
| 6 | GPg4 | 797 | <i>Pseudomonas migulae</i> CCUG 43165 ^T (AF074383) | 100 |
| 6 | HPg4 | 811 | <i>Psychrobacter glaciei</i> B1c20019 ^T (FJ748508) | 99.8 |
| 6 | ZMg10 | 1373 | <i>Psychrobacter glaciei</i> B1c20019 ^T (FJ748508) | 99.5 |
| 7 | CPi6 | 1024 | <i>Massilia aurea</i> AP13 ^T (AM231588) | 98.0 |
| 7 | DPi1 | 681 | <i>Arthrobacter pascens</i> VKM Ac-1116 ^T (X80740) | 99.9 |
| 7 | YPi4 | 1143 | <i>Carnobacterium inhibens</i> K1 ^T (Z73313) | 98.5 |

бактерии принадлежали родам *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Fronidhabitans*, *Micrococcus* (филум *Actinobacteria*), *Carnobacterium*, *Bacillus*, *Sporosarcina* (филум *Firmicutes*), *Massilia*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* (*Beta*- и *Gammaproteobacteria*) со сходством от 98.5 до 100 % с уже известными представителями этих родов.

Дендрограммы, построенные на основе сравнения последовательностей гена 16S рРНК (рис. 2), показывают, что среди актиномицетов штаммы *Arthrobacter* spp. являются представителями уже известных видов этого рода, а штаммы PMd1, CMb6 и LPf1 могут быть описаны как новые виды родов *Micrococcus*, *Cryobacterium* и *Fronidhabitans* соответственно (см. рис. 2, А). Среди штаммов, относящихся к филуму *Firmicutes*, штаммы YPi4 и OMh2 могут быть описаны как новые виды родов *Carnobacterium* и *Sporosarcina* (см. рис. 2, Б). Протеобактерии ZMg10, HPg4, GPg3 и BMg1, вероятно, представляют два новых вида рода *Psychrobacter*, а штамм CPi6 предполагается описать как новый вид рода *Massilia*.

Таким образом, с использованием методов секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и МАЛДИ МС анализа были идентифицированы до рода 27 штаммов аэробных бактерий. Среди полученных изолятов обнаружены представители *Actinobacteria* (58 %), *Proteobacteria* (23 %) и *Firmicutes* (19 %), некоторые из них филогенетически близки к ранее выделенным из ледников и пород о. Западный Шпицберген.

Последовательности генов 16S рРНК штаммов *Cryobacterium* sp. CMb6 (МК135913) и *Psy-*

chrobacter sp. BMg1 (МК135919) были близки последовательностям *Cryobacterium* sp. Asd M3-6 (FM955863) и *Psychrobacter glacincola* Kongs-17 (HE800823), полученным в ходе исследований ледников и фьордов Шпицбергена, со сходством 98.8 и 99.1 % соответственно. Как видно на рис. 2, многие исследованные бактерии образовывали кластеры с видами, впервые выделенными из холодных местообитаний.

Наиболее интересными для дальнейшего исследования бактериями представляются штамм ZMg10, относящийся к широко распространенному в ММО роду *Psychrobacter*, и штамм LPf1, относящийся к роду *Fronidhabitans*, представителей которого ранее не выделяли из ММО.

Клетки штамма ZMg10 являются неподвижными грамотрицательными кокками 1.5–2.0 мкм в диаметре (рис. 3, а). Штамм был выделен на среде 1/2 TSA при 20 °С, а в дальнейшем продемонстрировал хорошую способность к росту на мясопептонном агаре. На чашке он формировал выпуклые колонии серого цвета с ровным краем. При культивировании на жидких средах этот штамм давал труднорастворимый осадок. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма ZMg10 (МК135922) показал, что его ближайшим родственником является *Psychrobacter glaciei* B1c20019^T (сходство 99.9 %), выделенный из ледника Ловенбрин, о. Западный Шпицберген [Zeng et al., 2016]. Несмотря на высокое сходство генов 16S рРНК, штамм ZMg10, вероятно, является новым видом рода, так как для видов рода *Psychrobacter* характерно высокое сходство последовательностей этих генов.

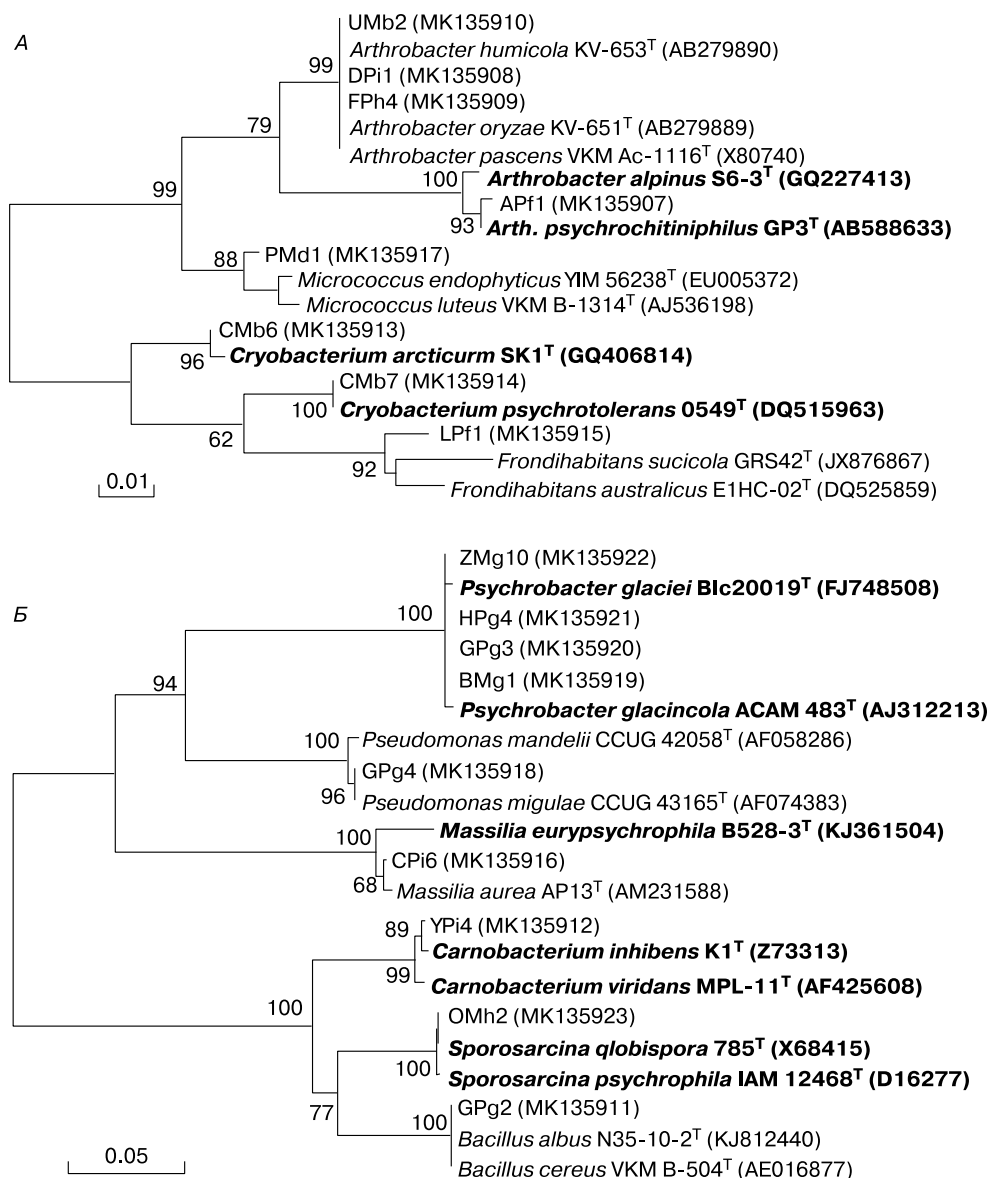


Рис. 2. Положение выделенных культур среди представителей филумов *Actinobacteria* (А), *Proteobacteria* и *Firmicutes* (Б) на филогенетических дендрограммах, построенных на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК по методу “ближайших соседей” (bootstrap = 1000).

В скобках даны номера последовательностей в NCBI, жирным шрифтом выделены близкородственные виды из постоянно холодных экосистем.

Штамм LPf1 относится к роду *Fron dihabitans* и является первым представителем этого рода, обнаруженным в ММО. Клетки штамма имеют вид мелких кокков в экспоненциальной фазе роста (диаметр 1.5–2.0 мкм) и небольших палочек в стационарной фазе (1.0 на 2.0–3.0 мкм) (см. рис. 3, б). При росте на чашках образовывал гладкие выпуклые колонии кремового цвета. Изначально штамм был выделен на среде 1/2 TSA при температуре 7–8 °С. Сходство по гену 16S рРНК (99.1 %)

штамма LPf1с его ближайшим родственником *Fron dihabitans australicus* E1HC-02^T (DQ525859) свидетельствует о том, что данный изолят может принадлежать новому виду. Ранее обнаруженные каротиноидпродуцирующие актинобактерии рода *Fron dihabitans* часто были ассоциированы с лишайниками и демонстрировали высокую протеазную и липазную активности в психрофильных условиях, что делает их перспективными объектами для биотехнологии [Lee et al., 2014].

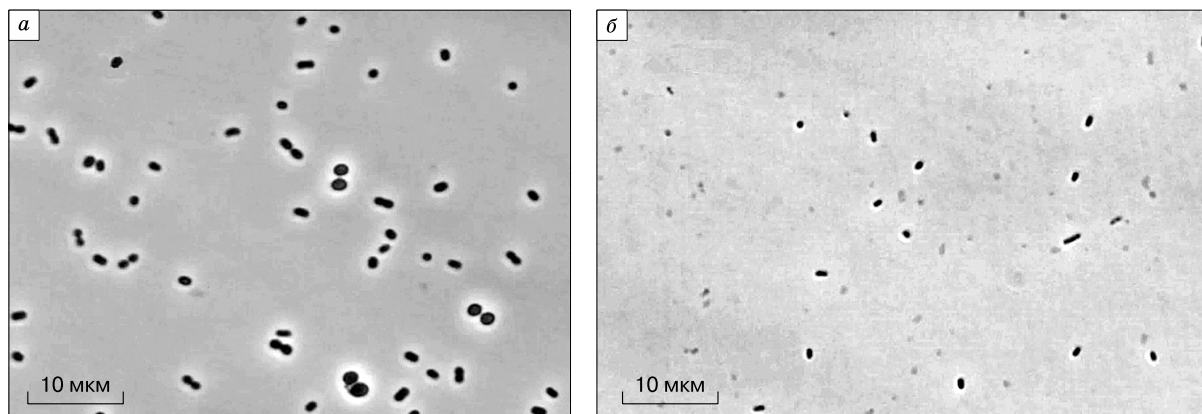


Рис. 3. Микрофотографии клеток штаммов ZMg10 (а) и LPf1 (б), фазовый контраст.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе микробиологического исследования проб мерзлых отложений о. Западный Шпицберген, отобранных вблизи пос. Баренцбург, была определена численность культивируемых аэробных и анаэробных микроорганизмов. Впервые в исследованных образцах ММО были обнаружены метаногенные археи и бактерии, образующие ацетат из H_2 и CO_2 . Выделены 60 штаммов аэробных психрофильных и психротолерантных бактерий, у 27 из которых определена родовая принадлежность.

Полученные данные расширяют наши представления о структуре микробных сообществ вечной мерзлоты. Дальнейшие исследования позволят более подробно изучить выделенные микроорганизмы и оценить перспективы их использования в биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы президиума РАН ПП 55 АРКТИКА АААА-А18-118013190182-3, государственных заданий АААА-А18-118013190181-6 и АААА-А16-116062110070-7, а также РФФИ (проект № 19-04-01240).

Литература

Гиличинский Д.А., Хлебникова Г.М., Звягинцева Д.Г. и др. Микробиологические характеристики при изучении осадочных пород криолитозоны // Изв. АН СССР. Сер. геол., 1989, № 6, с. 103–115.

Демидов Н.Э., Караевская Е.С., Веркулич С.Р. и др. Первые результаты мерзлотных наблюдений на криосферном полигоне Российского научного центра на архипелаге Шпицберген // Проблемы Арктики и Антарктики, 2016, № 4 (110), с. 67–79.

Петровская Л.Е., Новотоцкая-Власова К.А., Спирина Е.В. и др. Липолитические ферменты микроорганизмов из криопэгов вечной мерзлоты // Докл. РАН, 2012, т. 445, № 1, с. 102–105.

Спирина Е.В., Федоров-Давыдов Д.Г. Микробиологическая характеристика мерзлотных почв Колымской низменности // Почвоведение, 1998, № 12, с. 1462–1475.

Bakermans C., Ayala-Del-Rio H.L., Ponder M.A. et al. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, vol. 56, p. 1285–1291.

Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // Limnology and Oceanography, 1969, vol. 14, No. 3, p. 454–458.

Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. Methods for general and molecular bacteriology // Amer. Soc. Microbiology. Washington, Stackebrandt E, Goebel BM, 1994, p. 607654.

Gilichinsky D., Vishnivetskaya T., Petrova M. et al. Bacteria in permafrost // Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology / R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday (Eds.). Berlin, Springer, 2008, p. 83–102.

Grzesiak J., Gorniak D., Szwiański A. et al. Microbial community development on the surface of Hans and Werenskiöld Glaciers (Svalbard, Arctic): a comparison // Extremophiles, 2015, vol. 19, p. 885–897.

Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K. et al. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway // Environ. Microbiol., 2007, vol. 9, No. 11, p. 2870–2884.

Hungate R.E. A role tube method for cultivation of strict anaerobes // Methods of Microbiology / J.B. Norris, D.W. Ribbons (Eds.). New York, Academic Press, 1969, p. 117–132.

Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010, vol. 60, p. 455–459.

Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.). New York, John Wiley and Sons, 1991, p. 115–175.

Lee Y.M., Kim E.H., Lee H.K., Hong S.G. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria // World J. Microbiol. Biotechnol., 2014, vol. 30, No. 10, p. 2711–2721.

Lovley D.R., Philips E.J.P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments // J. App. Environ. Microbiol., 1986, vol. 51, No. 4, p. 683–689.

- Margesin R., Feller G.** Biotechnological applications of psychrophiles // *Environ. Technol.*, 2010, vol. 31, No. 8–9, p. 835–844.
- Marmur J.** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // *J. Molecular Biol.*, 1961, vol. 3, No. 2, p. 208–218.
- Marx J.C., Collins T., D'Amico S. et al.** Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms // *Mar. Biotechnol.*, 2007, vol. 9, No. 3, p. 293–304.
- Pecheritsyna S.A., Rivkina E.M., Akimov V.N., Shcherbakova V.A.** *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, vol. 62, p. 33–37.
- Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V. et al.** Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump // *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, No. 19, p. 4193–4196.
- Pikuta E.V., Marsic D., Bej A. et al.** *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, p. 473–478.
- Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T. et al.** Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. // *Extremophiles*, 2006, vol. 10, p. 285–294.
- Shcherbakova V.A., Chuvilskaya N.A., Rivkina E.M. et al.** Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium alboriphilum* sp. nov. // *Extremophiles*, 2005, vol. 9, p. 239–246.
- Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D.** *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, vol. 61 (pt. 1), p. 144–147.
- Shi T., Reeves R., Gilichinsky D., Friedmann E.I.** Characterization of viable Bacteria from Siberian permafrost by 16S rRNA sequencing // *Microbiol. Ecol.*, 1997, No. 33, p. 169–179.
- Singh P., Singh S.M., Singh R.N. et al.** Bacterial communities in ancient permafrost profiles of Svalbard, Arctic // *J. Basic. Microbiol.*, 2017, vol. 57, No. 12, p. 1018–1036.
- Slobodkin A.I., Wiegel J.** Fe(III) as an electron acceptor for H₂ oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas // *Extremophiles*, 1997, vol. 1, p. 106–109.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // *Molecul. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, No. 12, p. 2725–2729.
- Vishnivetskaya T., Kathariou S., McGrath J. et al.** Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments // *Extremophiles*, 2000, vol. 4, No. 3, p. 165–173.
- Wang F., Gai Y., Chen M., Xiao X.** *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, p. 2759–2762.
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S.** Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, p. 2882–2886.
- Yuan M.M., Jin Zhang J., Xue K. et al.** Microbial functional diversity covaries with permafrost thaw-induced environmental heterogeneity in tundra soil // *Glob. Chang. Biol.*, 2018, vol. 1, p. 297–307.
- Zeng Y.-X., Yu Y., Liu Y., Li H.-R.** *Psychrobacter glaciei* sp. nov., isolated from the ice core of an Arctic glacier // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, No. 4, p. 1792–1798.

References

- Gilichinsky D.A., Khlebnikova G.M., Zvyagintsev D.G., Fyodorov-Davydov D.G., Kudryavtseva N.N. Microbiological characteristics in the study of the sedimentary rocks of the cryolithozone. *Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Geol.*, 1989, No. 6, p. 103–115.
- Demidov N.E., Karaevskaya E.S., Verkulich S.R., Nikulina A.L., Savatyugin L.M. First results of permafrost monitoring on the cryospheric site of Russian Scientific Center on Spitsbergen (RSCS). *Problemy Arktiki i Antarktiki [Arctic and Antarctic Problems]*, 2016, vol. 110, No. 4, p. 67–79 (in Russian).
- Petrovskaya L.E., Novototskaya-Vlasova K.A., Spirina E.V., Khokhlova G.V., Rivkina E.M., Gilichinsky D.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Lipolytic enzymes of microorganisms from permafrost cryopegs. *Doklady Akademii Nauk [Proceed. of the Russian Academy of Sciences]*, 2012, vol. 445, No. 1, p. 102–105 (in Russian).
- Spirina E.V., Fyodorov-Davydov D.G. Microbiological characterization of cryogenic soils in the Kolymskaya lowland. *Pochvovedenie [Eurasian Soil Science]*, 1998, No. 12, p. 1462–1475 (in Russian).
- Bakermans C., Ayala-Del-Rio H.L., Ponder M.A. et al. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, vol. 56, p. 1285–1291.
- Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 1969, vol. 14, No. 3, p. 454–458.
- Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. Methods for general and molecular bacteriology. In: *Amer. Soc. Microbiology. Washington, Stackebrandt E, Goebel BM*, 1994, p. 607654.
- Gilichinsky D., Vishnivetskaya T., Petrova M., Spirina E., Mamykin V., Rivkina E. Bacteria in the permafrost. In: *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology / R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday (Eds.)*. Berlin, Springer, 2008, p. 83–102.
- Grzesiak J., Gorniak D., Szwiatecki A. et al. Microbial community development on the surface of Hans and Werenskiold Glaciers (Svalbard, Arctic): A comparison. *Extremophiles*, 2015, vol. 19, p. 885–897.
- Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K. et al. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 9, No. 11, p. 2870–2884.
- Hungate R.E. A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods of Microbiology / J.B. Norris, D.W. Ribbons (Eds.)*. New York, Academic Press, 1969, p. 117–132.
- Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, vol. 60, p. 455–459.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics / E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.)*. New York, John Wiley and Sons, 1991, p. 115–175.
- Lee Y.M., Kim E.H., Lee H.K., Hong S.G. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 30, No. 10, p. 2711–2721.

- Lovley D.R., Philips E.J.P. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *J. App. Environ. Microbiol.*, 1986, vol. 51, No. 4, p. 683–689.
- Margesin R., Feller G. Biotechnological applications of psychrophiles. *Environ. Technol.*, 2010, vol. 31, No. 8–9, p. 835–844.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Molecular Biol.*, 1961, vol. 3, No. 2, p. 208–218.
- Marx J.C., Collins T., D'Amico S. et al. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Mar. Biotechnol.*, 2007, vol. 9, No. 3, p. 293–304.
- Pecheritsyna S.A., Rivkina E.M., Akimov V.N., Shcherbakova V.A. *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, vol. 62, p. 33–37.
- Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.M. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, No. 19, p. 4193–4196.
- Pikuta E.V., Marsic D., Bej A. et al. *Carnobacterium pleistoecium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox Tunnel in Alaska. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, p. 473–478.
- Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T. et al. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 2006, vol. 10, p. 285–294.
- Shcherbakova V.A., Chuvilskaya N.A., Rivkina E.M., Pecheritsyna S.A., Laurinavichius K.S., Suzina N.E., Osipov G.A., Ly-senko A.M., Gilichinsky D.A., Akimenko V.K. Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles*, 2005, vol. 9, p. 239–246.
- Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, vol. 61 (pt. 1), p. 144–147.
- Shi T., Reeves R., Gilichinsky D., Friedmann E.I. Characterization of viable Bacteria from Siberian permafrost by 16S rRNA sequencing. *Microbiol. Ecol.*, 1997, No. 33, p. 169–179.
- Singh P., Singh S.M., Singh R.N. et al. Bacterial communities in ancient permafrost profiles of Svalbard, Arctic. *J. Basic. Microbiol.*, 2017, vol. 57, No. 12, p. 1018–1036.
- Slobodkin A.I., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H₂ oxidation in thermophilic anaerobic enrichment cultures from geothermal areas. *Extremophiles*, 1997, vol. 1, p. 106–109.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecul. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, No. 12, p. 2725–2729.
- Vishnivetskaya T., Kathariou S., McGrath J. et al. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*, 2000, vol. 4, No. 3, p. 165–173.
- Wang F., Gai Y., Chen M., Xiao X. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, p. 2759–2762.
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, p. 2882–2886.
- Yuan M.M., Jin Zhang J., Xue K. et al. Microbial functional diversity covaries with permafrost thaw-induced environmental heterogeneity in tundra soil. *Glob. Chang. Biol.*, 2018, vol. 1, p. 297–307.
- Zeng Y.-X., Yu Y., Liu Y., Li H.-R. *Psychrobacter glaciei* sp. nov., isolated from the ice core of an Arctic glacier. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, No. 4, p. 1792–1798.

Поступила в редакцию 10 марта 2019 г.,
после доработки – 20 июня 2019 г.,
принята к публикации 2 июля 2019 г.