

МИКРОБИОЛОГИЯ КРИОСФЕРЫ

УДК 579.26; 551.345
DOI: 10.15372/KZ20230605
EDN: TZUKRH

НОВЫЕ ПСИХРОАКТИВНЫЕ БАКТЕРИИ КРИОПЭГОВ
ПОЛУОСТРОВА ЯМАЛ

Я.В. Рыжманова^{1,*}, В.Э. Трубицын¹, Е.М. Ривкина¹, Н.Е. Сузина¹, А.О. Плотников²,
В.Я. Катаев², М.В. Молчанов³, Н.В. Молочков³, В.А. Щербакова¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований РАН”,
142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,
460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, Россия

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3, Россия

* Автор для контакта; e-mail: ryzhmanova@gmail.com

Приведены новые сведения о видовом разнообразии и метаболическом потенциале малоизученных микробных сообществ криопэгов полуострова Ямал. Подсчет общей численности микроорганизмов, населяющих криопэги, показал достаточно высокую плотность, составившую 10^6 – 10^8 кл/мл. При этом сульфатовосстанавливающие бактерии были обнаружены только в двух из трех криопэгах в численности, не превышающей 10^3 кл/мл. Из криопэгов впервые выделены представители бактериальных родов *Acetobacterium* (штаммы K1/0, K1/6 =VKM B-3638, K1/7, K1/8), *Labilibaculum* (K2S^T, =VKM B-3650^T) и *Trichococcus* (K1Tr^T, =VKM B-3651^T). Все изоляты являлись психроактивными и были способны расти при температуре 6 °С.

Ключевые слова: вечная мерзлота, криопэг, Ямал, сульфатовосстанавливающие бактерии, психрофилы, *Acetobacterium*, *Labilibaculum*, *Trichococcus*.

Ссылка для цитирования: Рыжманова Я.В., Трубицын В.Э., Ривкина Е.М., Сузина Н.Е., Плотников А.О., Катаев В.Я., Молчанов М.В., Молочков Н.В., Щербакова В.А. Новые психроактивные бактерии криопэгов полуострова Ямал // Криосфера Земли, 2023, т. XXVII, № 6, с. 51–58. DOI: 10.15372/KZ20230605. EDN: TZUKRH.

NEW PSYCHROACTIVE BACTERIA OF THE YAMAL PENINSULA CRYOPEGS

Ya.V. Ryzhmanova^{1,*}, V.E. Trubitsyn¹, E.M. Rivkina¹, N.E. Suzina¹, A.O. Plotnikov²,
V.Ya. Kataev², M.V. Molchanov³, N.V. Molochkov³, V.A. Shcherbakova¹

¹ Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

² Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Pionerskaya St. 11, Orenburg, 460000 Russia

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
Institutskaja St. 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

* Corresponding author; e-mail: ryzhmanova@gmail.com

New data on the species diversity and metabolic potential of insufficiently studied microbial communities in cryopegs of the Yamal Peninsula are presented. The total number of microorganisms inhabiting cryopegs is high and reaches 10^6 – 10^8 cells/mL. At the same time, sulfate-reducing bacteria have only been found in two out of three studied cryopegs in numbers not exceeding 10^3 cells/mL. Representatives of the bacterial genera *Acetobacterium* (strains K1/0, K1/6 =VKM B-3638, K1/7, K1/8), *Labilibaculum* (K2S^T, =VKM B-3650^T), and *Trichococcus* (K1Tr^T, =VKM B-3651^T) have been isolated from cryopegs for the first time. All isolates are psychroactive and are able to grow at 6 °C.

Keywords: permafrost, cryopeg, Yamal, sulfate-reducing bacteria, psychrophiles, *Acetobacterium*, *Labilibaculum*, *Trichococcus*.

ВВЕДЕНИЕ

Криопэги Ямала – уникальные экосистемы многолетнемерзлых отложений, сформировавшиеся в конце среднего плейстоцена в результате регрессии Полярного бассейна и перехода водонасыщенных морских донных отложений в субаэральное состояние с последующим вымораживанием солей и образованием незамерзших рассолов. Эти образования являются единственным видом свободной воды на Земле, характеризующимся постоянными отрицательными температурами, высокой соленостью и полной изолированностью от воздействия внешних факторов на протяжении геологического времени. Как показали исследования последних двух десятилетий [Печерицына и др., 2007; Rivkina et al., 2004; Gilichinsky et al., 2005; Rapp et al., 2021; Cooper et al., 2022], в криопэгах сформированы активные микробные сообщества, представленные психрофильными, психроактивными галофильными микроорганизмами различных физиологических групп, в том числе аэробными и анаэробными бактериями, археями, мицелиальными и одноклеточными грибами.

К настоящему времени из криопэгов выделено и описано небольшое количество микроорганизмов: *Clostridium algorithum* [Shcherbakova et al., 2005], '*Psychrobacter muriicola*' [Щербак ова и др., 2009], *Psychrobacter cryohalolentis* [Bakermans et al., 2006], *Celerinatantimonas yamalensis* [Shcherbakova et al., 2013], *Desulfovibrio arcticus* [Pecheritsyna et al., 2012], *Desulfovibrio gilichinskyi* [Ryzhmanova et al., 2019], *Geomyces pannorum* [Кочкина и др., 2007] и несколько штаммов неохарактеризованных представителей родов *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Dietzia* и *Citricoccus* [Петровская и др., 2012; Spirina et al., 2017].

Одной из ключевых адаптивных стратегий психрофильных и психротрофных бактерий является синтез устойчивых к холоду ферментов [Gerday et al., 2000]. Благодаря высокой каталитической активности при низких температурах холодоактивные ферменты будут полезны в качестве добавок к моющим средствам, биокатализаторов для биотрансформации лабильных соединений при низких температурах и биоремедиации загрязненных почв и сточных вод при низких и умер-

ренных температурах [Hamid et al., 2022]. Так, гены холодоактивной эстеразы были обнаружены в геноме *P. cyohalolentis* K5^T. Этот белок был клонирован в *Escherichia coli* и исследован с точки зрения его термостабильности и оптимальных каталитических условий. Оказалось, что в отличие от многих известных холодоактивных ферментов эстераза из бактерии, обитающей в криопэге, обладала относительно высокой термостабильностью, сохраняя более 60 % активности после инкубации в течение 1 ч при 80 °С [Novototskaya-Vlasova et al., 2012]. Таким образом, новые холодоустойчивые бактерии, выделенные из криопэгов, могут стать источником уникальных ферментов и биологически активных соединений.

Цель настоящей работы состояла в выделении новых таксонов психроактивных микроорганизмов и расширении представлений о разнообразии микробных сообществ криопэгов полуострова Ямал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Образцы воды криопэгов отобраны в 2013 г. Н.Э. Демидовым (лаборатория криологии почв, ИФХиБПП РАН) в позднеплейстоценовых аллювиальных отложениях в районе р. Яра-Яха и Бованенковского газового месторождения (70°29'00" с.ш., 68°00'00" в.д.) в области сплошного распространения многолетнемерзлых пород в горизонте переохлажденных засоленных почв. Среднегодовая температура мерзлых толщ –2...–4 °С. Основные гидрохимические характеристики воды криопэгов представлены в табл. 1.

Для стерильного отбора проб при колонковом бурении мерзлых пород станком УКБ-12/25 была использована методика Т. Ши с соавт. [Shi et al., 1997]. Отбор проб из скважин, вскрывающих криопэги, был осуществлен с помощью гидрохимического батометра ПЭ 1105 в предварительно стерилизованные бутылки объемом 500 мл. Отобранные пробы хранились до начала анализов при температуре –20 °С.

Микробиологические методы учета численности бактерий. Общее количество микроорганизмов в воде криопэгов было определено мето-

Таблица 1. Гидрохимическая характеристика воды криопэгов полуострова Ямал

Криопэг	Место отбора	Глубина отбора, м	рН	Минерализация, г/л	Ионный состав воды, г/л						
					K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
1У	Бованенковское газовое месторождение	120	7.9	14.60	0.12	0.196	2.0	2.04	0.46	9.59	0.19
2У	Устье р. Яра-Яха	5	7.4	56.23	0.85	16.35	0.52	2.38	1.02	31.24	2.88
3У	Пойма р. Яра-Яха	12.5–20.0	7.5	77.16	0.41	22.68	1.04	3.79	1.71	47.22	0.31

Примечание. Анализ выполнен М.С. Куприной (ИГЭ РАН).

дом прямого счета (МПС) по А.С. Разумову [1962].

Численность сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ) в образцах воды определяли методом предельных разведений (МПР), описанным ранее в [Ryzhmanova et al., 2019]. Рост СВБ определяли по образованию сероводорода при 660 нм на спектрофотометре Agilent Cary 300 (Agilent Technologies, USA) [Cline, 1969].

Среды и условия культивирования. Чистые культуры получены методом десятикратных разведений на анаэробных жидких и твердых средах следующего состава (г/л): K_2HPO_4 0.5; KCl 1.0; $MgSO_4$ 0.5; Na_2SO_4 2.0; $Na_2S_2O_3$ 1.0; NaCl 5.0; NH_4Cl 1.0; $CaCl_2$ 0.15; $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.25; раствор витаминов по Волину 5.0 мл [Wolin et al., 1963]; раствор микроэлементов 1.0 мл [Кевбрин, Заварзин, 1992]; лактат натрия 2.0.

Микроскопические методы исследования. Морфология клеток была изучена с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Japan), оснащенного камерой ProgRes Speed XT core 5 (Jenoptik, Germany).

Изучение физиолого-биохимических свойств изолятов. Оптимальные условия роста выделенных штаммов были определены по оптической плотности при 600 нм на спектрофотометре Agilent Cary 300 (Agilent Technologies, USA). Температурный диапазон роста был определен по удельной скорости роста при 0, 6, 12, 20, 26, 29, 32, 35, 37, 42 °С, диапазон солёности – по скорости роста при концентрациях NaCl 0, 1, 2, 3.5, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 100 г/л.

Конечные метаболиты были определены методом ЯМР-спектроскопии. Высушенный и очищенный метанольный экстракт был растворен в 540 мкл H_2O , затем к нему было добавлено 60 мкл 4 М натриевой соли 3-(триметилсилил)-пропионовой кислоты-d4 (TSP), полученная смесь была перемешана на шейкере в течение 30 с и центрифугирована при 15000g в течение 5 мин. Супернатант был помещен в калиброванную ЯМР-пробирку диаметром 5 мм. Спектры регистрировались на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 (Bruker, USA) с рабочей частотой 600 МГц, при температуре 298 К, ширине спектра 24 мд и 90-градусном импульсе 12.5 мкс. Количество сканов составило 128 сканирований с интервалом 10 с, затухание свободной индукции было зарегистрировано для 96 000 точек за 3.42 с. Калибровка химических сдвигов была проведена для сигнала TSP при 0.00 ppm, который служил внутренним стандартом. Двумерные спектры гомоядерной ($^1H-^1H$) спин-спиновой корреляции (COSY) для образцов регистрировались во всей области появления сигналов 0.3–9.3 ppm. В задержке релаксации перед импульсами COSY использовалось подавление сигнала воды предварительным насыщением. Вре-

мя задержки между импульсами COSY составляло 1 с, массивы данных состояли в среднем из 2048/512 точек. Для анализа данных использовались базы данных спектрального программного обеспечения AMIX (Bruker) и BMRB (Банк данных биологического магнитного резонанса).

Выделение ДНК, амплификация, секвенирование геномов. Для выделения бактериальной ДНК из образцов воды криопэггов бактерии были концентрированы с использованием пористой диафрагмы, ДНК были выделены набором Гомо-Сорб (Синтол, Россия). Геномная ДНК для полногеномного секвенирования была выделена набором Quick DNA Fungal/Bacterial Kit (Zymo Research, USA). Качество выделенной ДНК оценивалось по соотношению A260/280 с использованием прибора Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA) и по результатам горизонтального электрофореза в 1%-м агарозном геле. Концентрация ДНК была измерена с использованием набора dsDNA High Sensitivity Assay Kit на приборе Qubit 4 Fluorometer (Life Technologies, USA). ДНК-библиотека для полногеномного секвенирования была подготовлена с использованием набора NEBNext® Ultra™ II FS DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs, USA).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) с использованием пары универсальных праймеров 27f/1492r [Lane et al., 1991] на ген 16S рРНК.

Фрагментный состав библиотеки был проведен с помощью капиллярного электрофореза в полиакриламидном геле на платформе QIAxcel Advanced System с использованием набора QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Germany). Нормализация молярной концентрации библиотеки была проведена с использованием количественной ПЦР на платформе CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA). Парноконцевое секвенирование (2×250 п.н.) было проведено на платформе MiSeq (Illumina, USA) с использованием набора реагентов v. 2 (Illumina, USA). Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК было проведено с помощью универсальных праймеров 27f и 1492r [Lane et al., 1991] и набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Филогенетический и геномный анализ. Для поиска нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК использована программа BLAST базы данных GenBank [Sayers et al., 2019]. Последовательности выровнены с помощью программы CLUSTAL W [Larkin et al., 2007]. На основе нуклеотидных последовательностей фрагментов

гена 16S рРНК с использованием пакета программ MEGA6 построена филогенетическая дендрограмма с применением метода “поиска ближайших соседей” (neighbour-joining). Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов K1/6, K2S^T и KTr^T были депонированы в GenBank под номерами OP709879, OP722762 и OP722757 соответственно. Сборка и анализ генома проведены на сервере Kbase и GGDC. Геномы штаммов K1/6, K2S^T и KTr^T были депонированы в базе данных GenBank под номерами BioProject PRJNA984454, PRJNA985894 и PRJNA924143 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение численности бактерий в образцах воды криопэггов п-ова Ямал показало, что эти экосистемы, несмотря на постоянные отрицательные температуры и высокую минерализацию, имеют достаточно высокую плотность микроорганизмов. Численность составила $8.2 \cdot 10^8$, $4.2 \cdot 10^7$ и $3.2 \cdot 10^6$ кл/мл в криопэгах 1Y, 2Y и 3Y соответственно (табл. 2). Эти результаты согласуются с работами других ученых, изучавших микробное разнообразие арктических криопэггов [Gilichinsky et al., 2005; Rapp et al., 2021; Cooper et al., 2022].

СВБ были обнаружены только в криопэгах 1Y и 3Y в количестве $2 \cdot 10^3$ и $2 \cdot 10^2$ кл/мл соответственно (см. табл. 2). Следует отметить, что численность СВБ в ямальских криопэгах оказалась на 2–3 порядка ниже, чем в криопэгах Колымской низменности [Gilichinsky et al., 2005]. Методом предельных разведений не удалось детектировать СВБ в образце воды криопэга 2Y, что может быть связано с созданием неоптимальных селективных условий для присутствующих там сульфатредукторов. Тем не менее нельзя исключить их полное отсутствие. В таком случае терминальная стадия разрушения органического вещества в этой экосистеме, вероятно, осуществляется ацетогенными или метаногенными микроорганизмами.

С образцами воды криопэггов 1Y, 2Y и 3Y были поставлены накопительные культуры, обозначенные авторами как K1S, K2S и K3S соответственно. В результате использования метода десятикратных разведений на жидких и твердых средах из накопительной культуры K1S были вы-

делены штаммы бактерий, обозначенные авторами как K1/0, K1/6, K1/7, K1/8 и K1Tr^T. Из накопительной культуры K2S был выделен штамм K2S^T. Из криопэга 3Y ранее авторами была выделена и описана психротолерантная сульфатредуцирующая бактерия *Desulfovibrio gilichinskyi* [Ryzhmanova et al., 2019].

Микроскопирование клеток штаммов K1/0, K1/6, K1/7 и K1/8 (рис. 1, а) показало, что все они представлены одиночными или сдвоенными грамположительными короткими неспорообразующими палочками с закругленными концами размером $(0.5–0.7) \times (1.4–1.5)$ мкм. В логарифмической фазе роста клетки были подвижны, в стационарной фазе роста теряли подвижность. Клетки штамма K1Tr^T (см. рис. 1, б) имели кокковидную или овоидную форму размером 1.0–1.5 мкм, были неподвижные, располагались поодиночке, парами, короткими цепочками или собирались в неправильные конгломераты, не образовывали споры и по Граму окрашивались вариабельно. Клетки штамма K2S^T (см. рис. 1, в) были представлены тонкими прямыми неподвижными грамположительными палочками размером $0.5 \times (2.0–5.0)$ мкм.

Штаммы K1/0, K1/6, K1/7 и K1/8 являлись облигатными анаэробами, были способны расти гетеротрофно на бетаине, органических кислотах, моносахарах, спиртах, дрожжевом экстракте, казминовых кислотах, триптиказе, пептоне, а также автотрофно на смеси H₂ и CO₂. Эти штаммы росли в диапазоне температур от 6 до 35 °C с оптимумом 26 °C. Кроме того, они облигатно зависели от наличия ионов Na⁺ в среде и росли при концентрации NaCl от 1 до 70 г/л с оптимумом 3.5 г/л. Единственным конечным метаболитом штаммов K1/0, K1/6, K1/7 и K1/8 являлся ацетат. Филогенетический анализ (рис. 2) показал, что нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК изолятов K1/0, K1/6, K1/7 и K1/8 имеют 100%-е сходство между собой и с видом *Acetobacterium carbinolicum* WoProp1^T. У штамма K1/6 был секвенирован геном размером 3.84 Мб, состоящий из 77 контиггов, с целостностью (по CheckM) 100 %, содержанием G+C 42.53 мол.%. Сравнительный геномный анализ изолята K1/6 с референтным штаммом *A. carbinolicum* WoProp1^T было невозможно осуществить ввиду отсутствия генома последнего. Поэтому авторами для сравнения был взят геном штамма *Acetobacterium* sp. KB-1, имеющего 100%-е сходство по гену 16S рРНК с *A. carbinolicum* WoProp1^T. Значения ANI и ДНК–ДНК гибридизации между штаммами K1/6 и *Acetobacterium* sp. KB-1 составили 98.9 и 92.2 %, это является недостаточным для межвидового различия и позволяет предположить, что изолят K1/6 является новым штаммом вида *A. carbinolicum*.

Штамм K1Tr^T являлся факультативным анаэробом, был способен расти в диапазоне темпера-

Таблица 2. Общая численность бактерий и СВБ в криопэгах полуострова Ямал

Криопэг	Минерализация, г/л	Общая численность бактерий, кл/мл	СВБ, кл/мл
1Y	14.60	$8.2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^3$
2Y	56.23	$4.2 \cdot 10^7$	н.о.
3Y	77.16	$3.2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^2$

Примечание: н.о. – не обнаружено.

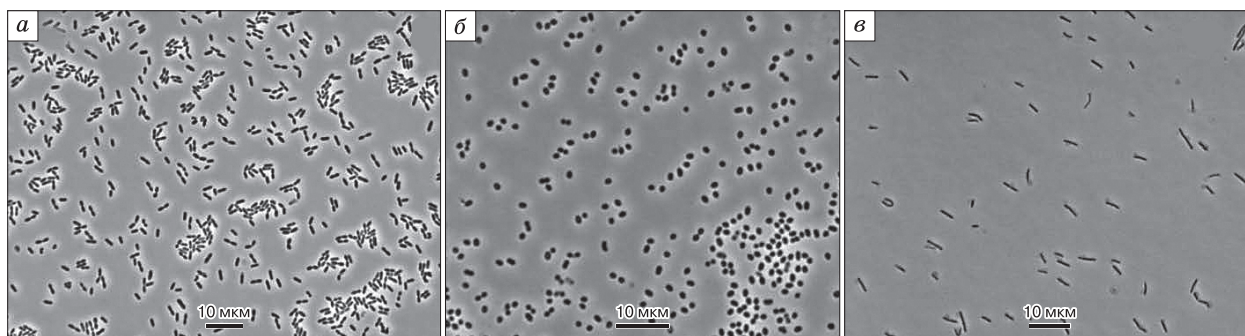


Рис. 1. Морфология клеток штаммов K1/6 (а), K1Tr (б) и K2S (в), фазовый контраст.

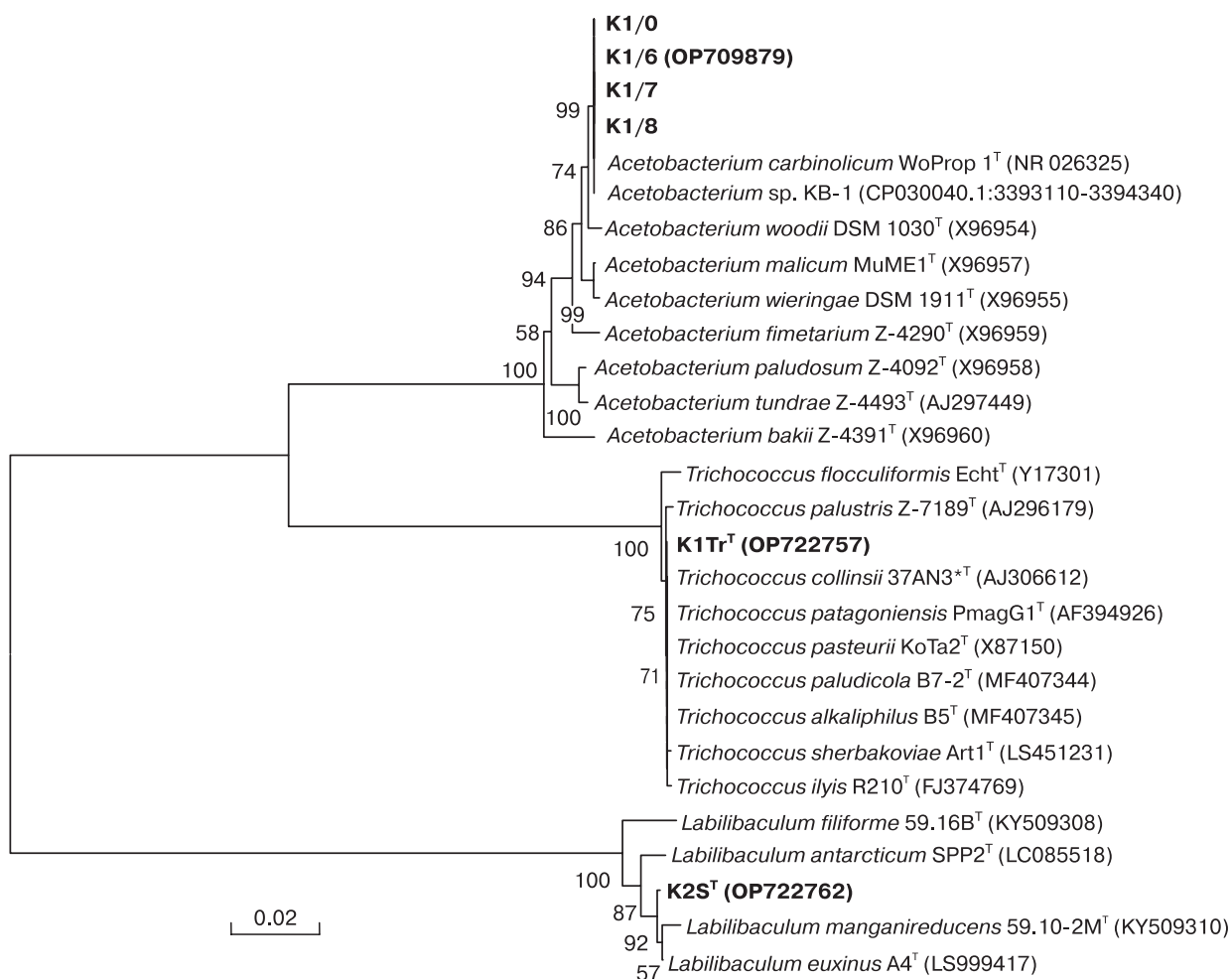


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК (1191 н.о.) и показывающее положение штаммов K1/0, K1/6, K1/7, K1/8, K1Tr^T и K2S^T среди представителей родов *Acetobacterium*, *Trichococcus* и *Labilibaculum*.

Дендрограмма построена с использованием метода "neighbour-joining". В точках ветвления – данные "bootstrap"-анализа (в процентах от 1000 реплик). В скобках – учетный номер базы данных GenBank. Длина масштабной линейки: 2 замены на 100 нуклеотидов.

тур от 6 до 37 °С с оптимумом 26 °С. Несмотря на то что рост штамма K1Tr^T не зависел от наличия ионов Na⁺ в среде, он был способен выдерживать соленость до 70 г/л. Оптимальным содержанием NaCl для роста было 1 г/л. Основными конечными метаболитами штамма K1Tr^T при росте на глюкозе являлись лактат, этанол, ацетат, формиат и, в качестве минорного компонента, сукцинат. У штамма K1Tr^T был секвенирован геном размером 3.11 Мб, состоящий из 44 контигов, с целостностью (по CheckM) 98.91 %, содержанием G+C 46.56 мол.%. Филогенетический анализ гена 16S рРНК штамма K1Tr^T выявил 100%-е сходство с *Trichococcus patagoniensis* и *T. collinsii* (см. рис. 2). Однако данные полногеномного секвенирования показали, что ближайшим родственником штамма K1Tr^T является *T. alkaliphilus* B5^T. Уровень сходства ДНК–ДНК гибридизации (63.1 %) и ANI (93.33 %) штамма K1Tr^T и *T. alkaliphilus* B5^T позволяют утверждать, что штамм K1Tr^T представляет собой новый вид рода *Trichococcus*.

Штамм K2S^T являлся облигатным анаэробом, был способен расти в диапазоне температур от 6 до 32 °С с оптимумом 24 °С, использовал для роста моно- и дисахара, а также пируват, лактат и глицерин. Штамм K2S^T облигатно зависел от наличия ионов Na⁺ в среде, рос в диапазоне NaCl от 1 до 70 г/л с оптимумом 20 г/л. Конечными метаболитами штамма K2S^T при росте на глюкозе являлись лактат, ацетат, пропионат сукцинат, пируват и, в качестве минорного компонента, формиат. Согласно филогенетическому анализу гена 16S

рРНК, штамм K2S^T принадлежит к семейству Marinifilaceae и кластризуется в роду *Labilibaculum* (см. рис. 2), все известные представители которого обнаружены в морских экосистемах и являются психротолерантными. Его ближайшими родственниками являются '*Labilibaculum euxinus* A4^T' и *Labilibaculum manganireducens* SPP2^T со сходством 98.78 и 98.70 % соответственно. У штамма K2S^T был секвенирован геном размером 5.26 Мб, состоящий из 86 контигов, с целостностью (по CheckM) 99.46 %, содержанием G+C 36.23 мол.%. Данные полногеномного секвенирования показали, что штамм K2S^T представляет собой новый вид рода *Labilibaculum*. Уровень сходства ДНК–ДНК гибридизации между штаммами K2S^T, '*L. euxinus* A4^T' и *L. manganireducens* SPP2^T составил 48.1 и 47.7 %, а показатель ANI равен 92.17 и 92.78 % соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из двух криопеггов п-ова Ямал выделены шесть новых штаммов психроактивных бактерий различных физиологических групп: ацетогенные бактерии *Acetobacterium* spp. K1/0, K1/6, K1/7, K1/8, сахаролитическая бактерия *Labilibaculum* sp. K2S^T и гетеротрофная бактерия *Trichococcus* sp. K1Tr^T. Штамм K1Tr^T близок по ряду фенотипических и физиолого-биохимических признаков к представителям рода *Trichococcus*. Как и все представители данного рода, штамм K1Tr^T способен расти при низких температурах и

Таблица 3. Потребляемые субстраты и конечные метаболиты микроорганизмов, выделенных из криопеггов Колымской низменности и полуострова Ямал

Микроорганизм	Субстрат / продукт	Источник
<i>Clostridium algoriphilum</i>	Глюкоза, моно- и дисахариды, инозитол, сорбит, маннит, целлобиоза, пептон, дрожжевой экстракт, fumarат, малат, триптиказа, трегалоза, ксилан, бетаин, холин/бутират, формиат, лактат, ацетат, этанол, H ₂ , CO ₂	[Shcherbakova et al., 2005]
<i>Geomyces pannorum</i>	Сахара/лактат, ацетат	[Кочкина и др., 2007]
<i>Celerinatantimonas yamalensis</i>	Глюкоза, моно- и дисахариды, целлобиоза, ксилан, дульцит, сорбит, глицерин, сукцинат, fumarат, малат, пируват, цитрат, глюконат, N-ацетилглюкозамин/ацетат, этанол, CO ₂	[Shcherbakova et al., 2013]
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	Цитрат, лактат, ацетат, глутаминовая кислота/CO ₂	[Bakermans et al., 2006]
' <i>Psychrobacter murincola</i> '	Дрожжевой экстракт, пируват, глутарат, fumarат, капроат, гептаноат, бутират, малат, лактат, цитрат, пролин, тирозин, метанол, бутанол, дульцит/CO ₂	[Щербаклова и др., 2009]
<i>Trichococcus</i> sp. K1Tr ^T	Глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, манноза, маннитол, дрожжевой экстракт, лактат/лактат, этанол, ацетат, формиат, сукцинат	Данные авторов
<i>Labilibaculum</i> sp. K2S ^T	Глюкоза, лактоза, ксилоза, целлобиоза, ацетилглюкозамин, глицерин, пируват и лактат/лактат, ацетат, пропионат сукцинат, пируват, формиат	Данные авторов
<i>Desulfovibrio arcticus</i>	Лактат, формиат, пируват, этанол, H ₂ + ацетат/ацетат, CO ₂	[Pecheritsyna et al., 2012]
<i>Desulfovibrio gilichinskyi</i>	Лактат, формиат, пируват, fumarат, аланин, этанол, H ₂ + ацетат/ацетат, CO ₂	[Ryzhmanova et al., 2019]
<i>Acetobacterium</i> spp. K1/0, K1/6, K1/7, K1/8	Бетаин, лактат, пируват, формиат, глицерин, метанол, этанол, этиленгликол, глюкоза, фруктоза, дрожжевой экстракт, казаминовые кислоты, триптиказа, пептон, H ₂ + CO ₂ /ацетат	Данные авторов

в широком диапазоне солености. Однако тот факт, что близкородственные виды являются почвенными обитателями, а также отсутствие зависимости роста штамма K1Gr^T от ионов Na⁺ приводят к выводу, что данный штамм попал в воду криопэга из окружающих его многолетнемерзлых грунтов и впоследствии эффективно адаптировался к невысокой минерализации криопэга 1У. Штаммы K1/0, K1/6, K1/7, K1/8 и K2S^T являются облигатными галофилами и, по всей видимости, представляют собой аборигенную микрофлору криопэга.

Анализ данных о культивируемом микробном разнообразии криопэгов Арктики, как приведенных в настоящей работе, так и полученных ранее, позволяет считать, что микробиом криопэгов представляет собой полностью автономную, изолированную экосистему, где все микроорганизмы являются звеньями одной трофической цепи (см. табл. 3). Так, бактерии *Clostridium algoriphilum*, *Celerinatantimonas yamalensis*, целлюлозолитические микромицеты *Geomyces pannorum* способны использовать в качестве источника углерода остатки клеточных стенок бактерий, поставляя субстраты для бактерий родов *Psychrobacter*, *Trichococcus*, *Labilibaculum*, СВБ и ацетогенов. Конечные метаболиты представителей родов *Trichococcus* и *Labilibaculum* также могут служить субстратами для ацетогенов и СВБ, являющихся конечными деструкторами органического вещества в криопэгах, а также, благодаря способности к автотрофному росту, еще и продуцентами органического вещества.

Полученные авторами данные расширили представления о структуре и функционировании микробного сообщества уникальной закрытой экосистемы криопэгов и дополнили функциональные пробелы в трофических цепях анаэробной части циклов углерода, серы и азота.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1051).

Литература

Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология, 1992, т. 61, № 5, с. 812–817.
 Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Акимов В.Н. и др. Гало-психротолерантные грибы рода *Geomyces* из криопэгов и морских отложений Арктики // Микробиология, 2007, т. 76, № 1, с. 39–47.
 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.
 Печерицына С.А., Щербакова В.А., Холодов А.Л. и др. Микробиологический анализ криопэгов Варандейского полуострова на побережье Баренцева моря // Микробиология, 2007, т. 76, № 5, с. 694–701.

Разумов А.С. Микробный планктон воды // Тр. Всесоюз. гидробиологического о-ва. М., Изд-во АН СССР, 1962, т. 12, с. 60–188.
 Щербакова В.А., Чувильская Н.А., Ривкина Е.М. и др. Новая галотолерантная бактерия из криопэга в вечной мерзлоте: описание *Psychrobacter muriicola* sp. nov. // Микробиология, 2009, т. 78, № 1, с. 98–105.
 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 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, vol. 56, p. 1285–1291.
 Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // Limnol. Oceanogr., 1969, vol. 14, No. 3, p. 454–458.
 Cooper Z.S., Rapp J.Z., Shoemaker A. et al. Evolutionary divergence of *Marinobacter* strains in cryopeg brines as revealed by pangenomics // Front. Microbiol., 2022, vol. 13, p. 879116.
 Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M. et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology // Trends Biotechnol., 2000, vol. 18, No. 3, p. 103–107.
 Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C. et al. Biodiversity of cryopegs in permafrost // FEMS Microbiol. Ecol., 2005, vol. 53, No. 1, p. 117–128.
 Hamid B., Bashir Z., Yatoo A.M. et al. Cold-active enzymes and their potential industrial applications – A Review // Molecules, 2022, vol. 27, No. 18, p. 5885.
 Lane D. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). N.Y., John Wiley and Sons, 1991, p. 125–175.
 Larkin M.A., Blackshields G., Brown N. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics, 2007, vol. 23, No. 21, p. 2947–2948.
 Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Yakimov S., Gilichinsky D. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian cryopeg // FEMS Microbiol. Ecol., 2012, vol. 82, No. 2, p. 367–375.
 Pecheritsyna S.A., Rivkina E.M., Akimov V.N., Shcherbakova V.A. *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2012, vol. 62, p. 33–37.
 Rapp J.Z., Sullivan M.B., Deming J.W. Divergent genomic adaptations in the microbiomes of Arctic subzero sea-ice and cryopeg brines // Front. Microbiol., 2021, vol. 12, p. 701186.
 Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J. et al. Microbial life in permafrost // Advan. Space Res., 2004, vol. 33, p. 1215–1221.
 Ryzhmanova Y., Abashina T., Petrova D., Shcherbakova V. *Desulfovibrio gilichinskyi* sp. nov., a cold-adapted sulfate-reducing bacterium from a Yamal Peninsula cryopeg // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2019, vol. 69, No. 4, p. 1081–1086.
 Sayers E.W., Agarwala R., Bolton E.E. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information // Nucleic Acids Res., 2019, vol. 47, D1: D23–D28.
 Shcherbakova V., Chyvil'skaya N., Rivkina E. et al. 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., Chyvil'skaya N., Rivkina E. et al. *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine // Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2013, vol. 63, p. 4421–4427.
 Shi T., Reeves R., Gilichinsky D., Friedmann E. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing // Microbial Ecol., 1997, vol. 33, No. 3, p. 169–179.

Spirina E.V., Durdenko E.V., Demidov N.E. et al. Halophilic-psychrotrophic bacteria of an Alaskan cryopeg – a model for astrobiology // *Paleontol. J.*, 2017, vol. 51, p. 1440–1452.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, No. 8, p. 2882–2886.

References

Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. Effect of sulfur compounds on the growth of the halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. *Microbiology [Mikrobiologiya]*, 1992, vol. 61, p. 563–567.

Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Akimov V.N. et al. Halo- and psychrotolerant Geomyces fungi from arctic cryopegs and marine deposits. *Mikrobiologiya [Microbiology]*, 2007, vol. 76, No. 1, p. 39–48.

Petrovskaya L.E., Novototskaya-Vlasova K.A., Spirina E.V. et al. Lipolytic enzymes of microorganisms from cryopegs of permafrost. *Dokl. Akad. Nauk*, 2012, vol. 445, No. 1, p. 102–105 (in Russian).

Pecheritsyna S.A., Shcherbakova V.A., Kholodov A.L. et al. Microbiological analysis of cryopegs of the Varandeykii Peninsula on the coast of the Barent Sea. *Mikrobiologiya [Microbiology]*, 2007, vol. 76, p. 694–701 (in Russian).

Razumov A.S. Water Microbial Plankton. *Trudy Vsesoyuznogo gidrobiologicheskogo obshchestva [Proc. of Hydrobiol. Society]*, 1962, vol. 12, p. 60–190 (in Russian).

Shcherbakova V., Chuvil'skaya N., Rivkina E. et al. Novel halotolerant bacterium from cryopeg in permafrost: Description of *Psychrobacter muriicola* sp. nov. *Microbiology [Mikrobiologiya]*, 2009, vol. 78, No. 1, p. 84–91 (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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, vol. 56, p. 1285–1291.

Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 1969, vol. 14, No. 3, p. 454–458.

Cooper Z.S., Rapp J.Z., Shoemaker A. et al. Evolutionary divergence of *Marinobacter* strains in cryopeg brines as revealed by pangenomics. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13, p. 879116.

Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M. et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 2000, vol. 18, No. 3, p. 103–107.

Gilichinsky D., Rivkina E., Bakermans C. et al. Biodiversity of cryopegs in permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, vol. 53, No. 1, p. 117–128.

Hamid B., Bashir Z., Yattoo A.M. et al. Cold-active enzymes and their potential industrial applications – A Review. *Molecules*, 2022, vol. 27, No. 18, p. 5885.

Lane D. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). N.Y., John Wiley and Sons, 1991, p. 125–175.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, No. 21, p. 2947–2948.

Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Yakimov S., Gilichinsky D. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T from Siberian cryopeg. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2012, vol. 82, No. 2, p. 367–375.

Pecheritsyna S.A., Rivkina E.M., Akimov V.N., Shcherbakova V.A. *Desulfovibrio arcticus* sp. nov., a psychrotolerant sulfate-reducing bacterium from a cryopeg. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, vol. 62, p. 33–37.

Rapp J.Z., Sullivan M.B., Deming J.W. Divergent genomic adaptations in the microbiomes of Arctic subzero sea-ice and cryopeg brines. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, p. 701186.

Rivkina E., Laurinavichius K., McGrath J. et al. Microbial life in permafrost. *Advan. Space Res.*, 2004, vol. 33, p. 1215–1221.

Ryzhmanova Y., Abashina T., Petrova D., Shcherbakova V. *Desulfovibrio gilichinskiji* sp. nov., a cold-adapted sulfate-reducing bacterium from a Yamal Peninsula cryopeg. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2019, vol. 69, No. 4, p. 1081–1086.

Sayers E.W., Agarwala R., Bolton E.E. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, D1: D23–D28.

Shcherbakova V., Chyvil'skaya N., Rivkina E. et al. 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., Chuvil'skaya N., Rivkina E. et al. *Celerinatantimonas yamalensis* sp. nov., a cold-adapted diazotrophic bacterium from a cold permafrost brine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, p. 4421–4427.

Shi T., Reeves R., Gilichinsky D., Friedmann E. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbiol. Ecol.*, 1997, vol. 33, No. 3, p. 169–179.

Spirina E.V., Durdenko E.V., Demidov N.E. et al. Halophilic-psychrotrophic bacteria of an Alaskan cryopeg – a model for astrobiology. *Paleontol. J.*, 2017, vol. 51, p. 1440–1452.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, No. 8, p. 2882–2886.

Поступила в редакцию 27 июня 2023 г.,
после доработки – 18 октября 2023 г.,
принята к публикации 11 ноября 2023 г.